

14. 5. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 08 JUL 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されてPCT
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 5月16日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-139513
[ST. 10/C]: [JP 2003-139513]

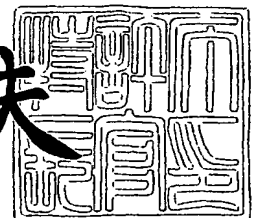
出 願 人
Applicant(s): ハウス食品株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3052135

【書類名】 特許願

【整理番号】 P03-0425

【提出日】 平成15年 5月16日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A23L 1/00

【発明の名称】 食品または食品原材料中の特定植物属の定量的 P C R 検出法

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 ハウス食品株式会社内

 【氏名】 平尾 宜司

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号 ハウス食品株式会社内

 【氏名】 平元 雅之

【特許出願人】

 【識別番号】 000111487

 【氏名又は名称】 ハウス食品株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

 【識別番号】 100118773

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】 100111741

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 夏夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 食品または食品原材料中の特定植物属の定量的PCR検出法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 PCR法による食品または食品原材料中の特定植物属に含まれる植物を定量する方法であって、

定量対象である特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、

被検対象である食品または食品原材料試料に既知量の標準植物由来の試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、

定量対象である特定植物属由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマー、および標準植物由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマーを用いて各サンプルから抽出したゲノムDNAをテンプレートとして定量的PCR法を実施すること、

補正標準値として、補正用サンプルについて上記定量的PCR法によって標準植物由来DNAのコピー数/特定植物属由来DNAのコピー数の値を求めること、ならびに

被検サンプルについて上記定量的PCR法によって特定植物属由来DNAのコピー数/標準植物由来DNAのコピー数の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属の植物の量を算出すること、

を含む上記方法。

【請求項 2】 定量的PCR法がリアルタイムPCR法である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 リアルタイムPCR法が、5' 末端に発光色素および3' 末端に消光剤を有している、増幅標的配列に対するPCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側にハイブリダイズするプローブであって、5' 末端の発光色素は3' 末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR反応においてTaqポリメラーゼによってプライマーからDNAが伸長されると、Taqポリメラーゼの5'→3' エ

キソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解されることにより、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とするプローブを用いて、発光量に基づいてDNAを定量する方法である、請求項2記載の方法。

【請求項4】 標準植物試料が、畑地雑草および食用作物以外の植物種である、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

【請求項5】 標準植物試料が、スターチスである請求項4記載の方法。

【請求項6】 配列番号57および配列番号58記載の配列からなるスターチス検出用プライマーセット。

【請求項7】 対象の特定植物属が、ソバ、小麦または落花生である、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

【請求項8】 標準植物由来の試料としてのスターチス定量用として、配列番号57および配列番号58記載の配列からなるプライマーセット、ならびに配列番号59からなる配列を有し、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を有するプローブを含む、食品または食品原材料中の特定植物属に含まれる植物を定量するためのキット。

【請求項9】 さらに、標準植物由来の試料としてスターチスを含む、請求項8記載のキット。

【請求項10】 ソバ属定量用として、配列番号14および配列番号15記載の配列からなるプライマーセット、ならびに配列番号64からなる配列を有し、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を有するプローブをさらに含む、請求項8または9記載のキット。

【請求項11】 スターチスおよびソバについての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAとソバの増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、請求項9または10記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属の定量的検出方法に

関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

2002年4月より、日本において、アレルギーの原因となる特定原材料について製品への表示制度が開始された。したがって、食品については特定原材料として、小麦、ソバ、落花生、乳および卵の5品目について下記の条件に沿って表示が義務づけられた〔非特許文献1、2〕。これに伴い、厚生労働省からは、特定原材料について、一次スクリーニング用のポリクローナル抗体による定量ELISA法ならびに確定試験用の定性PCR法（小麦、ソバ、落花生）およびウェスタンブロット法（乳、卵）の試験が通知されている。ELISA法については2種のELISAキットのうちのいずれかの定量値が10ppm以上（特定原材料の総タンパク質量／最終製品重量に換算）であり、かつPCR法（小麦、ソバ、落花生）またはウェスタンブロット法（乳、卵）による定性試験で陽性となった場合に表示が必要とされている〔非特許文献3〕。

【 0 0 0 3 】

一般に、ELISA法は非常に高感度のタンパク質検出法であり、当該方法は当技術分野においては慣用技術となっている。しかしながら、ポリクローナル抗体を用いたELISA法では交差反応性が比較的高く、非特異的なタンパク質を検出する可能性があるため（石川栄治監訳：エンザイムイムノアッセイ（1989））、偽陽性の判定が出る可能性がある。偽陽性について検定するためには、他の方法で再確認することを要する。

【 0 0 0 4 】

また、ELISA法は、高感度である一方、測定におけるダイナミックレンジが狭い。測定におけるダイナミックレンジが狭いということは、未知の濃度の試料を正確に測定するためには、何段階かに希釈した検液を用意して、検量線の範囲内に収まる検液の測定結果を選択する必要性が生じる可能性がある。さらに、通常ELISAによる測定では、被検対象とする試料毎の抽出効率やELISA反応の阻害などの影響に対する補正が考慮されておらず、特に食品のような多岐に渡る加工処理および混入物が推定される試料等を測定して定量値を出す場合には注意が必要であ

る。

【0005】

さらに、例えば、市販のソバタンパク質検出用ELISAの検出感度は、キット付属の検量線用標準ソバタンパク質検液で 1ng/ml (20~400倍希釈してELISAに供したとすると、特定原材料の総タンパク質量/最終製品重量に換算すると0.02~0.1ppm) と高感度である [非特許文献4、5、8、9]。しかしながら、例えばソバの総タンパク質量/試料重量に換算してこのレベルの濃度となるソバ粉を含む試料から2gをサンプリングした場合、検出対象の特定原材料の粒径がかなり細かくないと、試料からはソバ粉の粒をサンプリングできない恐れもあり得る。

【0006】

一方、混入したソバを検出するためのPCR法として現在知られているものは、感度がそばDNA量として約5pgであり、小麦中にソバを添加した試料では約10ppmのソバが検出できるが、この公知の方法では定量分析はできない [非特許文献6、7]。

【0007】

また、本発明者らは、特定植物属の存在を検出するための方法として、1ppm以上 (DNA/DNA) の感度で検出可能なITS配列を標的とした定性PCR法を開発し、2002年9月27日付けで特許出願 (出願番号: 特2002-284222) をしたが、当該方法では定量分析はできない。

【0008】

遺伝子組換え作物のPCRによる定量法として、遺伝子組換えとうもろこしに特有の遺伝子配列のコピー数を測定し、別途測定したとうもろこしに固有の内在性遺伝子配列のコピー数で補正を行い、とうもろこし原料中の遺伝子組換えとうもろこし原料の量を測定するものがある [非特許文献10]。

【0009】

詳しくは、まず純粋な遺伝子組換えとうもろこしの代表的な品種を使用して、その種子から抽出したDNAの「組換えDNA配列のコピー数/内在性遺伝子配列のコピー数」の値 (内標比) を求める。次に、未知試料の「組換えDNA配列のコピー数/内在性遺伝配列のコピー数」の値を求め、これに内標比の逆数と100を乗じ

て遺伝子組換えとうもろこしの混入率を測定するものである。この方法では、種々の品種のとうもろこしでコピー数が同じであり、かつ共通な塩基配列を持つ内在性遺伝子を内部標準として用いているため、とうもろこしならとうもろこしというように同じ植物種からなる試料中での組換え体の含有量を定量することには適している。

【0 0 1 0】

しかしながら、様々な生物種や無生物の原料からなる混合物中に存在するアレルギーの原因となる特定原材料の量を測定することを考えた場合、様々な生物種のDNAの中から内部標準として用いることのできる内在性配列を見出すことは困難であり、さらには無生物の様にDNAの無いものからそれを見出すことは不可能である。

【0 0 1 1】

【非特許文献 1】

「厚生労働省ホームページ：アレルギー物質を含む食品に関する表示について」 (<http://www.mhlw.go.jp/topics/0103/tp0329-2b.html>)

【非特許文献 2】

「食品衛生学雑誌 (Joournal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUJIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2 0 0 2 年, 第 4 3 巻, 第 4 号, p. j - 2 6 9 - j - 2 7 1

【非特許文献 3】

厚生労働省ホームページ：「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」 (食発第1106001号)

(http://www.hourei.mhlw.go.jp/~hourei/cgi-bin/t_docframe.cgi?MODE=tsuchi&DMODE=CONTENTS&SMODE=NORMAL&KEYWORD=&EFSNO=4642)

【非特許文献 4】

「食品衛生学雑誌 (Joournal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUJIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2 0 0 2 年, 第 4 3 巻, 第 4 号, p. j - 2 7 5 - j - 2 7 7

【非特許文献 5】

「食品衛生学雑誌 (Journal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002年, 第43巻, 第4号, p. j-277-j-279

【非特許文献6】

「食品衛生学雑誌 (Journal of the Food Hygienics Society of Japan (SHOKUHIN EISEIGAKU ZASSHI))」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002年, 第43巻, 第4号, p. j-280-j-282

【非特許文献7】

「(社) 日本食品衛生学会第84回学術講演会 講演要旨集」, (日本), 社団法人 日本食品衛生学会, 2002年, p. 104

【非特許文献8】

日本ハム株式会社 FAST KIT (Food Allergen Screening Test) シリーズ エライザ そば-ELISA BUCKWHEAT-＜＜取扱い説明書＞＞

【非特許文献9】

株式会社森永生科学研究所 モリナガ そば 測定キット 取扱い説明書

【非特許文献10】

「ジャーナル オブ エーオーエーシー インターナショナル (Journal of AOAC INTERNATIONAL)」, (米国), エーオーエーシー インターナショナル (AOAC INTERNATIONAL), 2002年, 第85巻, 第5号, p. 1077-1089

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出方法として、より欠点の少ない方法を開発することを試みた。すなわち、被検対象とする試料毎の抽出効率や検出反応の阻害などの影響に対する補正が可能であり、ELISA法よりダイナミックレンジが広く、かつ食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出に十分な特異性および感度を有する定量方法の開発を目的として、本発明を検討した。

【0013】

【課題を解決するための手段】

すなわち、被検対象とする試料毎の抽出効率や検出反応の阻害などの影響を考慮するために標準植物由来の試料を用いて補正すること、検出のダイナミックレンジが公知のELISA法に比べて広いこと、ならびに十分な特異性および感度を有することを特徴とする、定量的PCR検出法の確立を鋭意検討し、本発明を完成させるに至った。

【0014】

すなわち、本発明は、

1. PCR法による食品または食品原材料中の特定植物属に含まれる植物を定量する方法であって、

定量対象である特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、

被検対象とする食品または食品原材料試料に既知量の標準植物由来の試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、

標準植物由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマー、および定量対象とする特定植物属由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマーを用いて各サンプルから抽出したゲノムDNAをテンプレートとして定量的PCR法を実施すること、

補正標準値として、補正用サンプルについて上記定量的PCR法によって標準植物由来DNAのコピー数/特定植物属由来DNAのコピー数の値を求めること、ならびに

被検サンプルについて上記定量的PCR法によって特定植物属由来DNAのコピー数/標準植物由来DNAのコピー数の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料中に含まれる特定植物属に含まれる植物の量を算出すること、

を含む上記方法、

2. 定量的PCR法がリアルタイムPCR法である、上記1記載の方法、

3. リアルタイムPCR法が、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を

有している、増幅標的配列に対するPCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側にハイブリダイズするプローブであって、5'末端の発光色素は3'末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR反応においてTaqポリメラーゼによってプライマーからDNAが伸長されると、Taqポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解されることにより、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とするプローブを用いて、発光量に基づいてDNAを定量する方法である、上記2記載の方法、

4. 標準植物試料が、畑地雑草および食用作物以外の植物種である、上記1～3のいずれか1項記載の方法、

5. 標準植物試料が、スターチスである上記4記載の方法、

6. 配列番号57および配列番号58記載の配列からなるスターチス検出用プライマーセット、

7. 対象の特定植物属が、ソバ、小麦または落花生である、上記1～5のいずれか1項記載の方法、

8. 標準植物由来の試料としてのスターチス定量用として、配列番号57および配列番号58記載の配列からなるプライマーセット、ならびに配列番号59からなる配列を有し、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を有するプローブを含む、食品または食品原材料中の特定植物属に含まれる植物を定量するためのキット、

9. さらに、標準植物由来の試料としてスターチスを含む、上記8記載のキット、

10. ソバ属定量用として、配列番号14および配列番号15記載の配列からなるプライマーセット、ならびに配列番号64からなる配列を有し、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を有するプローブをさらに含む、上記8または9記載のキット、

11. スターチスおよびソバについての検量線を作製するための、スターチスの増幅標的配列を含むDNAとソバの増幅標的配列を含むDNAとを連結して含む検量線作製用プラスミドをさらに含む、上記9または10記載のキット、に関する。

【0015】

本発明の方法、すなわち、被検対象とする試料毎のDNA抽出効率やPCR反応の阻害などの影響に対する補正の方法として、外部からDNAを標準として添加して反応溶液中のPCR反応の阻害などの影響に対する補正を行うのではなく、外部から精製DNA以外の標準植物由来の試料を添加したサンプルから定量対象の特定植物属由来のDNAと標準植物由来のDNAを同時に抽出して定量的PCR法を行うという方法は、未だ本発明者は知らない。かかる方法により、標準植物由来の試料と対象の特定植物属由来の試料との間で、DNA抽出効率やPCR反応の阻害等の影響が均一な条件で測定できるため、非常に信頼度の高い定量が可能である。また、DNA抽出効率やPCR反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中のDNA含有量の違いに対しても補正が可能であるという、有利な効果を有している。さらに、PCR法による定量分析は、偽陽性が出た場合に、そのPCR増幅産物をDNA配列の解析に供することにより、確実に偽陽性を除外することができるという点から、産業上利用性に優れているといえる。したがって、本発明は、食品または食品原材料中に含まれるアレルギーの原因となる特定植物属に含まれる植物の定量的検出に有用である。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明においては、定量対象である特定植物属由来のDNAを特異的に増幅させるためのプライマーを設計する。すなわち、45S rRNA前駆体遺伝子配列中で特定植物属に共通する塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに3'末端が特定植物属のITS-1配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（A）またはITS-2配列中の塩基と相補的に結合するプライマー（B）を1種以上使用したPCRの後、特定植物属のITS-1またはITS-2配列の少なくとも一部を含むPCR増幅産物の存在を指標として特定植物属の存在を検出することができるプライマーを設計する。

【0017】

なお、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、2つのDNA断

片がSambrook Jらによって記載されたような標準的なハイブリダイゼーション条件下で、相互にハイブリダイズすることを意味する (Expression of cloned genes in E. coli (Molecular Cloning: A laboratory manual (1989)) Cold Spring harbor Laboratory Press, New York, USA, 9. 47-9. 62及び11.45-11.61) 。より具体的には、例えば以下の式で求められる T_m 値を基準としてハイブリダイゼーション (例えば約 $3.0 \times \text{SSC}$ または $2.0 \times \text{SSC}$ 、 30°C または 37°C) を行った後、ハイブリダイゼーションの条件よりストリンジェンシーの高い条件での洗浄 (例えば約 $2.0 \times \text{SSC}$ 、 30°C 、 37°C 、 40°C 、 44°C もしくは 48°C 以上、または $1.0 \times \text{SSC}$ もしくは $0.5 \times \text{SSC}$ 、 37°C 以上など) を行うことを意味する。ハイブリダイズする塩基配列などに応じて適宜ハイブリダイゼーションおよび洗浄に適切な「ストリンジェントな条件」を選択することは、当技術分野では周知技術である。なお、本明細書中、単に「ハイブリダイズする」と記載する場合も、特に条件等を言及しているものを除き、ストリンジェントな条件でハイブリダイズすることを意味する。

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\text{fraction G+C}) - (600/N)$$

【0018】

また、本明細書でいう属とは、属に含まれる植物全部を含むもの、または属に含まれる植物の中から選んだ幾つかの種を含むものを意味する。

また、45S rRNA前駆体遺伝子配列中で特定植物属に共通する塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに3'末端が特定植物属のITS-1配列中の塩基と相補的に結合するプライマー (A) またはITS-2配列中の塩基と相補的に結合するプライマー (B) を、少なくとも1個以上含むことが重要である。ここで、プライマー (A) はITS-1と5.8S rRNA遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするもの及びITS-1とSSU rRNA遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするものをも含む。同様に、プライマー (B) はITS-2と5.8S rRNA遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするもの及びITS-2とLSU rRNA遺伝子配列との境界を含む領域にハイブリダイズするものをも含む。プライマー (A) 及び (B) は少なくとも15個の塩基からなるものが好ましく、より好まし

くは15から30個の塩基からなる。ITS-1配列及びITS-2配列は種に特異的な配列を多く含んでいるので、45S rRNA前駆体遺伝子配列中で特定植物属に共通する塩基配列を有する核酸分子としてITS-1またはITS-2配列中で特定植物属に共通する特異的な塩基配列を有する核酸分子を好適に選択することにより特定種類の植物属に共通する特異性を持つプライマー (A) または (B) を得ることができる。また、プライマー (A) または (B) を1個または2個以上使用してもよく、2個以上使用する場合には、さらに特定種類の植物属(殊にソバ属)に対する特異性が高くなる。

【0019】

また、別の態様としては、プライマー (A) と、特定植物属のITS-1、5.8S rRNA遺伝子、ITS-2及びLSU rRNA遺伝子が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (C) とを使用する。あるいはプライマー (A) と、特定植物属のSSU rRNA遺伝子及びITS-1が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (E) とを使用する。さらに、別の態様としては、プライマー (B) と、特定植物属のSSU rRNA遺伝子、ITS-1、5.8S rRNA遺伝子及びITS-2が連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (D) とを使用する。あるいはプライマー (B) と、特定植物属のITS-2及びLSU rRNA遺伝子に連続して結合した配列の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマー (F) とを使用する。ここで、5.8S rRNA遺伝子は保存性が高く、大多数の植物に共通な配列を多く含んでいる。それ故、プライマー (C) として、5.8S rRNA遺伝子の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに3'末端が5.8S rRNA遺伝子配列中の塩基配列と相補的に結合するプライマーを好適に選択することにより、またはプライマー (D) として、5.8S rRNA遺伝子の一部の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであって、該核酸分子とハイブリダイズしたときに3'末端が5.8S rRNA遺伝子配列

中の塩基配列と相補的に結合するプライマーを好適に選択することにより、該プライマーは種々の植物に対して共通して使用することも可能である。これらのプライマーを固定し、ITS-1またはITS-2領域から検出したい特定植物属に共通する特異的なプライマーを選択することによって、該特定植物属に含まれる植物の混入を高感度で検出するためのプライマーを容易に設計することができる。プライマー（C）～（F）は少なくとも15個の塩基からなるものが好ましく、より好ましくは15から30個の塩基からなる。

【0020】

これらプライマーを設計するに当たっては、例えば「PCR法最前線—基礎技術から応用まで」（タンパク質・核酸・酵素 臨時増刊号1996年 共立出版株式会社）や「バイオ実験イラストレイテッド3本当に増えるPCR：細胞工学別紙 目で見える実験ノートシリーズ」（中山広樹著1996年 株式会社秀潤社）、「PCRテクノロジー—DNA増幅の原理と応用—」（Henry A Erlich編、加藤邦之進監修 宝酒造株式会社）等に基づいて設計すればよいが、未加工品からの検出の場合には、DNAが分解している可能性が少ないので、700塩基以内の増幅産物を得ることができるプライマーであってもよく、加工食品からの検出の場合には、DNAが分解して短くなっている可能性が考えられ、このような観点から200塩基以内の増幅産物を得ることができるプライマーが高い感度を得ることができるという点から好ましい。

【0021】

上述の観点から、プライマー（C）または（D）は配列番号1で表される塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーであることが好ましい。5.8S rRNA遺伝子配列は、ほぼ全域にわたって植物間で相同性が高いため、どこの領域にハイブリダイズするプライマーであっても使用することができるが、配列番号1は特に高い相同性を有する領域であるため、前記プライマーが好ましい。さらに好ましくは、配列番号1の位置11～63の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を有する核酸分子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得るプライマーである。このようなプライマー（C）としては、配列番号2～4で表されるオリゴヌクレオ

チドが好ましい（配列番号1にハイブリダイズする）。また、このようなプライマー（D）としては、配列番号5～7で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい（配列番号1の相補鎖にハイブリダイズする）。前記プライマーは、標的とする核酸分子と特異的にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることが必要であり、またハイブリダイズしたプライマーがプライマーとして機能し、伸長反応が起きるには3'末端の塩基が標的とするDNA配列部分と相補的な塩基となっている必要がある。従って、このような要件を満たしていれば、前記プライマーは、配列番号2～7で表される塩基配列の1個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。

【0022】

ITS-1やITS-2配列中で特定植物属に共通する特異的な塩基配列は、検出対象である特定植物属および他の植物属の種々の植物のITS-1～5.8S rRNA遺伝子～ITS-2配列をGenBankから取得し、アライメントを行い、該特定植物属に共通かつ、特異性の高い領域を探すことによって特定することができる。さらに、この特定した領域の中から、特に該特定植物属とその近縁種と考えられる植物との特異性が確保できる塩基を3'末端の塩基に設定して、プライマー配列を選定することができる。

【0023】

例えば、特定植物属がソバ属の場合、ITS-1配列中で共通する特異的な塩基配列としては、市販ソバの大多数が*Fagopyrum esculentum*（普通ソバ）であることや実際の市販ソバの配列がGenBankの*Fagopyrum esculentum*（普通ソバ）配列と合致したことにより、*F. esculentum*の配列から選択すればよく、具体的には、配列番号8、9または10で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号8の位置11～61の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号9の位置11～67の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列を挙げるができる。また、配列番号10は、特にソバ属の一部である*F. esculentum*（普通ソバ）、*F. tataricum*（ダツタンソバ）、*F. homotropicum*、*F. cymosum*を特異的に検出したいプライマーを選ぶ領域として有用である。

【0024】

プライマー (A) としては、配列番号 11～16 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 11～14 は配列番号 8 の相補鎖に、配列番号 15 及び 16 は配列番号 9 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 11～16 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。また、ITS-2 配列中で共通する特異的な塩基配列としては、配列番号 36 または 37 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。これらは、特にソバ属の一部である *F. esculentum* (普通ソバ)、*F. tataricum* (だったんソバ)、*F. homotropicum*、*F. cymosum* を特異的に検出したいプライマーを選ぶ領域として有用である。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 11～14 のいずれかと配列番号 15、16 または配列番号 2～4 のいずれかとの組み合わせが好ましい。

【0025】

特定植物属が落花生属の場合、ITS-1 配列中で共通する特異的な塩基配列としては、市販落花生の大多数が *Arachis hypogaea* であるが、実際の市販落花生の配列が GenBank の *A. correntina*、*A. villosa* の配列と合致したことにより、*A. villosa* の配列から選択すればよく、具体的には、配列番号 17～20 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 17 の位置 11～62 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 18 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 19 の位置 11～50 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 20 の位置 11～58 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

【0026】

プライマー (A) としては、配列番号 21～31 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 21～23 は配列番号 17 の相補鎖に、配列番号 24 および 25 は配列番号 18 の相補鎖に、配列番号 30 および 31 は配列番号 20 の相補鎖に、配列番号 26～29 は配列番号 19 に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは、上記のとおりそれぞれ

の相手側の配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであれば、配列番号 21～31 で表される塩基配列のうちの 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列を有するものであってもよい。また、ITS-2 配列中で共通する特異的な塩基配列としては、配列番号 38 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 38 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。さらに、プライマー (B) としては、配列番号 39 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 38 にストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号 39 で表される塩基配列の 1 個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号 21、24 または 25 と配列番号 2～4 のいずれかとの組み合わせ、配列番号 21、24 または 25 と配列番号 39 との組み合わせ、または配列番号 39 と配列番号 5～7 のいずれかとの組み合わせ、または配列番号 21～23、30 および 31 のいずれかと配列番号 26～29 のいずれかとの組み合わせが好ましいが、配列番号 21、24、および 25 のいずれかと配列番号 2～4 のいずれかとの組み合わせ、または配列番号 23 または 31 と配列番号 26～29 のいずれかとの組み合わせがより好ましい。

【0027】

特定植物属が小麦属の場合、ITS-2 配列中で共通する特異的な塩基配列として、配列番号 40～42 で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号 40 の位置 11～50 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 41 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号 42 の位置 11～47 の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

【0028】

プライマー (B) としては、配列番号 43～45 で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい (配列番号 43 は配列番号 40 の相補鎖に、配列番号 44 は配列番号 41 に、配列番号 45 は配列番号 42 に、それぞれストリンジェントな条件で

ハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号43～45で表される塩基配列の1個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号43と配列番号44および45の1個以上との組み合わせが好ましい。

【0029】

特定植物属が大豆属の場合、ITS-2配列中で共通する特異的な塩基配列として、配列番号46、47または48で表される塩基配列あるいはそれらの相補鎖の塩基配列を挙げることができる。好ましくは、配列番号46の位置11～48の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号47の位置11～55の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列、配列番号48の位置11～52の塩基配列またはその相補鎖の塩基配列である。

【0030】

プライマー(B)としては、配列番号49～56で表されるオリゴヌクレオチドが好ましい(配列番号49は配列番号46の相補鎖に、配列番号50～65は配列番号47に、配列番号56は配列番号48に、それぞれストリンジェントな条件でハイブリダイズする)。また、前記プライマーは配列番号49～56で表される塩基配列の1個または数個の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列で表されるオリゴヌクレオチドであってもよい。そして、プライマーの組み合わせとしては、配列番号49と配列番号50～56の1個以上との組み合わせが好ましい。

これらプライマーの設計や、設計したプライマーの評価にあたっては、PCRシミュレーションを利用しても良い。

【0031】

例えば、ソバ属を検出するプライマーの設計においては、食用ソバ(普通ソバ、ダツタンソバ)を含むソバ属の植物21配列に共通かつ特異性の高い領域をITS-1～5.8S rRNA遺伝子～ITS-2配列部分から見出し、さらに他の植物との特異性が確保できる塩基を3'末端の塩基に設定して配列を選定する。ただし、ソバ属の場合ITS-1～5.8S rRNA遺伝子～ITS-2配列部分においては、種ごとに塩基の欠落部

分や欠落塩基数に違いがあるため、ソバ属の植物21配列すべてから同じサイズの増幅産物を得るためには、さらに選別する必要がある。同じサイズの増幅産物を得ることができれば、容易にソバ属の存在を検出することができる。ソバ属では、特にプライマー (A) とプライマー (C)、または2個のプライマー (A) を選定することによって、ソバ属の植物21配列すべてから同じサイズの増幅産物を得ることがシミュレーションで確認できる。これにより、サイズによって非特異産物との識別が容易にできるプライマーを設計することができる。

【0032】

本発明においては、上記プライマーを用いて、定量対象である特定植物属に含まれる植物を定量的PCR法により定量する。

PCRに当たっては、例えばSaiki RK, et al., Science, 230:1350-1354(1985)や植物細胞工学別冊、植物のPCR実験プロトコル、島本功・佐々木卓治監修(1995年)等に記載されている通常の方法に基づき、変性、アニーリング、伸長の各ステップの温度と時間、酵素(DNAポリメラーゼ)の種類と濃度、dNTP濃度、プライマー濃度、塩化マグネシウム濃度、鋳型DNA量等の条件を適宜、変更し最良のものを選択する。

【0033】

また、PCR増幅で使用するプライマーとテンプレートDNAのアニーリング温度を、HYB SimulatorTM version 4.0 (Advanced Gene Computing Technologies, Inc.) やPrimer ExpressTM version 1.5 (Applied Biosystems社) 等の市販ソフトで算出した該プライマーのT_m値よりも高い温度、好ましくはT_m値+10~+3℃に設定してPCR増幅を行い、次いでアニーリング温度を該プライマーのT_m値近傍、好ましくはT_m値+7~±0℃の温度に設定してPCR増幅を行うこともできる。

【0034】

定量的PCR法としては、リアルタイムPCR法を用いる定量方法が好ましい。リアルタイムPCR法としては、サイバークリーン (SYBR Green) 法、TaqMan (商標) プローブ法などの蛍光プローブ (Fluorogenic probe) 法、モレキュラービーコン (Molecular Beacon) 法、およびLightCycler (商標) プローブ法などが挙げられるが、これらに限定はされない。種々の方法が最近精力的に開発されており

、当業者であれば、任意の方法を実施することができる。この場合のプロープの設計に当たっては、増幅標的配列に対するPCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側に、ストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る配列から選択する。

【0035】

特に、上記の通り設計された特定植物特異的プライマーと、5'末端に発光色素および3'末端に消光剤を有している、増幅標的配列に対するPCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側に、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするプローブであって5'末端の発光色素は3'末端の消光剤によってその発光が抑制されているが、PCR反応においてTaq ポリメラーゼによってプライマーからDNAが伸長されると、Taq ポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により上記プローブが分解されることにより、発光色素と消光剤とが解離して発光を生じることを特徴とするプローブとを用いて、発光量に基づいてDNAを定量する方法が好ましい。また、プローブ配列全体が上記PCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側に存在する必要はなく、設計したプローブの3'末端側の塩基とプローブがハイブリダイズする鎖の逆鎖に設計したプライマーの3'末端側の塩基とが1～10、または1～5塩基重複していてもよい。また、プローブ配列は、定量対象である特定植物属に共通な配列を有する部分から選択することがより好ましい。上記プローブには、TaqManプローブ（商標）が好ましい。TaqManプローブの設計方法は、当技術分野では公知である（Applied Biosystems社のPrimerExpress ソフトウェア 簡易操作ガイド PrimerExpress ソフトウェア TaqManプローブ検索のための簡易操作ガイド：Rev.C (<http://www.appliedbiosystems.co.jp/website/jp/product/ctlgpage.jsp?MODELCD=19775&PLCD=17689&BUCD=131>などを参照のこと）。

【0036】

該プローブに用いる発光色素としては、FAM、HEX、TETおよびFITCなどが知られているが、これらに限定はされない。また、消光剤としてはTAMRA、Dabcylなど、および非蛍光性消光剤も知られているが、やはり、これらに限定はされない。

【0037】

上記プローブの長さとしては、13～30塩基長が好ましく、特に13～25塩基長が好ましい。また、短い塩基長でも T_m 値が高く維持できるように、3'末端の消光剤にさらに、MGB (Minor Groove Binden) を標識したプローブを使用することが、より好ましい。具体的には、そば属の場合のプローブとしては配列番号64で表わされるオリゴヌクレオチドを例示することができる。落花生属のプローブとしては、プライマーに配列番号24と25のいずれかと配列番号2～4のいずれかとを組み合わせる場合には配列番号32または33で表される塩基配列の相補鎖の塩基配列に、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが好ましく、また、プライマーに配列番号21～23のいずれかと配列番号26～29のいずれかとを組み合わせる場合には、配列番号34で表されるオリゴヌクレオチドを例示することができる。さらにプライマーに配列番号30、31のいずれかと配列番号26～29のいずれかとを組み合わせる場合には、配列番号34で表されるオリゴヌクレオチドに加え、配列番号35で表される塩基配列あるいはその相補鎖の塩基配列にストリンジェントな条件でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが好ましい。

【0038】

かかるプローブは、設計した配列のオリゴヌクレオチドを合成した後、市販のキットを使用して作製することも可能であり、またカスタムオーダーにて委託作製も可能であり、当技術分野では多数委託先が知られている（例えば、Applied Biosystems社(<http://www.appliedbiosystems.co.jp>)など）。

【0039】

本発明の定量方法は、定量対象である特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料とを予め定めた比率で混合した補正用サンプルと、被検対象とする食品または食品原材料試料に既知量の標準植物由来の試料を添加した被検サンプルとを用い、これらのサンプルから同一の手法でゲノムDNAを抽出し、同一の条件で定量的PCR法を行うことにより、補正用サンプルについて標準植物由来DNAのコピー数(L_0)／特定植物属由来DNAのコピー数(F_0)の値を補正標準値として求め、被検サンプルについて特定植物属由来DNAのコピー数(F_s)／標準植物由来DNAのコピー数

(Ls)の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、食品または食品原材料(1 g)中に含まれる特定植物属の植物の量(μ g)を以下の式によって算出する。

$$\text{特定植物属の植物の量ppm } (\mu\text{g/g}) = F_s / L_s \times L_o / F_o \times 1,000,000$$

【0040】

したがって、該方法では、被検対象とする食品や食品原材料試料ごとのDNA抽出効率やPCR反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中のDNA含有量の違いに対しても補正が可能である。かかる方法によって、例えば塩等のDNAを含有していない食品原材料や当該原材料を含む食品中の特定植物属に含まれる植物を適切に定量検出することも可能である。

【0041】

さらに、偽陽性か否かの判断をする必要がある場合には、PCR終了後の反応液中に含まれるPCR増幅産物のDNA配列を解析することにより、厳密に調べることができる。

【0042】

本発明に用いる標準植物由来の試料は、種々の成分によるDNA抽出効率への影響がなるべく均質であることが望ましいことから、定量対象である特定植物属に類似の状態のものであることが好ましい。また、検査に供する食品または食品原材料中に混入する可能性のない植物種に由来するものが好ましい。また、栽培過程で、畑地雑草が食用作物に混入する可能性を排除することが極めて困難であり、微量の雑草由来の物質が食用作物中に混入しているとの現状に鑑みて、かかる畑地雑草として認知されている植物種以外の植物種を標準植物由来の試料とすることが好ましい。すなわち、標準植物由来の試料の選定に当たっては、食品または食品原材料に使用する植物が混入する恐れがなく、かつ食品または食品原材料中に混入する恐れがないものを選定する必要がある。

【0043】

該畑地雑草としては、様々な畑地雑草が知られているが、主には、イネ科、タケ亜科、ガマ科、カヤツリグサ科、キク科、タデ科、ツユクサ科、トクサ科、クワ科、スベリヒユ科、ナデシコ科、アカザ科、マメ科、カタバミ科、トウダイグ

サ科、セリ科、ヒルガオ科、シソ科、オオバコ科、ナス科、ウリ科などが挙げられる。詳細には、日本雑草学会のホームページ等の記載を参照されたい。

また、例えば市販されている種子等、一度に大量に均一の材料を入手可能でき、それを保存しておけるものが、標準植物由来の試料としてさらに好ましい。

【0044】

さらに、標準植物由来の試料は植物のいかなる組織（種子、葉、根茎など）に由来するものでもよいが、定量対象がソバ、小麦および落花生等の種子に由来するものであれば、同様の種子に由来するものであることが好ましい。このような観点から言えば、例えば、すいか、パパイア、メロン等を含まない食品について検査する場合には、皮や果肉により外界と隔離された果肉の中に数多くの種子が存在する、すいか、パパイア、メロン等の植物種が好ましい。また、種子が外界とは隔離されていなくとも、食用作物として栽培されていない植物種であれば好ましい。このような条件を考慮すると、本発明に用いる標準植物由来の試料としては、上記条件を満たすものであれば特に限定はされないが、ネモフィラ（ハゼリソウ科）、グロキシニア（イワタバコ科）およびスターチス由来のものが挙げられ、スターチス（イソマツ科）の種子が特に好ましい。

【0045】

標準植物由来の試料としては、DNA抽出阻害活性またはPCR反応阻害活性を有する成分の含量が高いものは、DNA抽出効率、ならびに定量的PCR法の感度および／または精度等の観点から、避けた方が好ましい。

【0046】

本明細書中の実施例には、標準植物由来の試料としてスターチスの種子を用いた例を挙げている。上述のように畑地雑草は食用作物に混入する恐れが高く、標準植物由来の試料としては不適切であるため、畑地雑草として日本雑草学会のホームページ (<http://wssj.ac.affrc.go.jp>) に挙げられている 860 種類の植物全部の科名を調べ、その中にない科に属する植物としてスターチスが選択された。スターチスの ITS-1 配列を特異的に検出するプライマーを用いて、一般的な食品原材料である市販の小麦粉 5 種類、コーングリッツ 5 種類、カラシ 3 種類についてスターチスの混入の有無を試験したが、いずれにおいても全く検出されな

ったことから、スターチスは、本発明における標準植物由来の試料として好適であると推定された。

【0047】

尚、スターチスの代わりに、畑地雑草を数多く含むイネ科の中の米を標準植物由来の試料として用いることが好ましくないことを本発明者らは確認している。これは、畑地雑草であるイネ科植物が原材料植物の収穫の際等に、収穫物に混入するためであると考えられる。

【0048】

標準植物由来の試料として選択した植物材料（例えばスターチスの種子）を粉碎したものを定量対象である特定植物属由来の試料として選択した植物（例えばそば）の粉碎物と予め定めた比率で混合して補正用サンプルを用意する。これとは別に、上記と同様の標準植物由来の試料の粉碎物を被検対象である食品または食品原材料試料に添加して被検サンプルを調製する。なお、上記粉碎工程においては、他の食品原材料や、特に対象とする特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料とが、お互いに混入しないように、十分に配慮することが重要であり、粉碎に使用する器具等の洗浄等に万全を期すべきである。なお、上記補正用および被検サンプルを調製するに当たっては、補正用サンプル中の特定植物由来の試料の量と被検サンプル中の食品または食品原材料試料の量はほぼ同じ量とすることが好ましく、また、補正用サンプル中の標準植物由来の試料の量と被検サンプル中の標準試料由来の試料の量はほぼ同じ量とすることが好ましい。

【0049】

次に、これらサンプルからDNAを抽出する。このDNAの抽出は、種々の公知の方法によって行うことができ、市販のキットまたはプレパックカラムを用いることもできる。例えば、QIAGEN Genomic DNA HandbookやUser-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tipを参考にして、QIAGEN社製のGenomic-tipを用いればよい。

【0050】

そして、抽出されたDNAを定量的PCR法に供する。定量分析のためのPCR技術は、種々のものが公知であるが、TaqManプローブ（登録商標）を用いるリアルタイム

ムPCR定量法が簡便かつ有利であろう。

【0051】

標準植物由来の試料の定量用のプライマーは、標準植物由来の試料のDNAに特異的な増幅をもたらすプライマーであることが好ましい。さらには、定量対象である特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料を予め定めた比率で混合した補正用サンプルから抽出したゲノムDNAに対して定量的PCR法を行った時の標準植物由来のDNAのコピー数が、特定植物属由来のDNAのコピー数とかけ離れておらず、両者のコピー数の差が100倍以内、好ましくは10倍以内になるプライマーであることが、前述の L_0/F_0 比が安定するため好ましい。

【0052】

例えば、スターチスを標準植物由来の試料とする場合、スターチスのプライマーは、そのITS-1配列の一部に由来する以下の配列：

5'-TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC-3' (配列番号57) および

5'-CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT-3' (配列番号58)

からなるプライマーを用いることができ、さらに、定量用のスターチスTaqManプローブとしては、前述した如く、増幅標的配列に対するPCRプライマーがハイブリダイズする部位の内側にハイブリダイズするものであればよく、例えば、ITS-1配列の一部に由来する以下の配列：

5'-TGT GCG ACG CGG AAT G-3' (配列番号59)

を有するプローブに蛍光色素を標識してTaqManプローブとして用いることができる。

【0053】

リアルタイムPCR定量法により、補正用サンプルおよび被検サンプルの標準植物由来のDNAのコピー数と定量対象の特定植物属由来のDNAのコピー数を、検量線から算出する。

【0054】

この検量線の作製は、当業者であれば種々の方法により容易に実施できる。標準植物由来の試料および定量対象の特定植物属由来の試料についての定量的PCR法による増幅標的配列を含む既知の長さのDNAをテンプレートとして用いて定量

的PCR法を実施して検量線を作製することができる。

【0055】

さらには、標準植物由来の試料および対象の特定植物属由来の試料についての定量的PCR法による増幅標的配列を含む検量線用のプラスミドを作製し、これをテンプレートに用いることにより、より再現性が高く、誤差の少ない検量線を作製することができる。定量対象とする特定植物属由来の試料の増幅標的配列を含むDNAと、標準植物由来の試料の増幅標的配列を含むDNAとを1つのプラスミドベクターに挿入した検量線用プラスミドを作製する。該プラスミドを、大腸菌等で増幅させることにより、検量線用のテンプレートを得ることができる。

【0056】

例えば、標準植物由来の試料および定量対象の特定植物属由来の試料についての定量的PCR法による増幅標的配列を、アウタープライマーとブリッジプライマーを用いるJayaraman K.らの方法(1992. BioTechniques 12: 392-398)を用いて連結することができる。

【0057】

1つのプラスミド中に標準植物由来の試料および定量対象の特定植物属由来の試料についての増幅標的配列を含有させることにより、希釈による両配列の濃度の誤差を低減させることができる。また、短いプラスミドDNA分子を用いることによっても、希釈の誤差を低減させ得る。

【0058】

検量線用テンプレートは、その塩基長が既知であるものを使うため、重量濃度と塩基長より検量線用テンプレート溶液中に含まれるコピー数が決定できる。このコピー数に照らして、被検サンプル中に含まれるコピー数を算定する。

【0059】

こうした本発明の定量的PCR検出法の考え方は、定量対象である特定の原料が畜産製品等の動物に由来するものである場合、および特定の原料が微生物に由来するものである場合にも適用することは可能であり、定量対象である特定の原料が畜産製品等の動物に由来するものである場合は動物由来の原材料を標準試料とすることが好ましく、特定の原料が微生物に由来するものである場合は、微生物

由来の原材料を標準試料とすることが好ましい。また、使用するプライマーおよびプローブは、当業者であれば容易に適宜設計することができる。

【0060】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1

A. DNA抽出に用いた植物試料

(1) ソバの種子:

タカノ株式会社より販売されている白花ソバ（普通ソバ *Fagopyrum esculentum* : 2倍体）、ダツタンソバ（*Fagopyrum tataricum* : 2倍体）の種子を用いた。

(2) 小麦、落花生、大豆、とうもろこし、カラシ、スターチスの種子と白胡椒、米（玄米）:

市販品を用いた。

(3) 小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、ソバカズラの葉:

市販品の種子から発芽させた葉を用いた。

【0061】

B. DNA抽出

(1) ソバの種子、白胡椒からのDNA抽出

QIAGEN Genomic DNA HandbookやUser-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tipを参考にして、QIAGEN社製のGenomic-tipを用い、以下の方法で行った。

細かく粉碎した試料1gを15ml容チューブに入れ、4mlのCarlson Lysis バッファー（0.1M Tris-HCl (pH 9.5)、2% CTAB、1.4M Polyethylene Glycol #6000、20mM EDTA）、8 μ lのRNase A（100mg/ml）、10 μ lの2-メルカプトエタノール、80 μ lのプロテイナーゼK（20mg/ml）を加え、混合した後、74℃で20分間保温した。室温に戻した後、これに5mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。この水層に等量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。再度、この水層に等量のクロ

ロホルム：イソアミルアルコール（24：1）を加え、良く混合した後、遠心分離により水層を回収した。

【0062】

得られた水層の1/2量を取り、イソプロパノール沈殿により沈殿物を回収した。沈殿物は500 μ lのバッファー QBTに溶解し、予め1mlのバッファー QBTで平衡化したGenomic-tip 20/Gに供してDNAをカラムに吸着させた。その後、5mlのバッファー QBT、続いて2mlのバッファー QCでカラムを洗浄した。最終的に1.7mlのバッファー QFで溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を40 μ lの滅菌超純水に溶解した。溶液中のDNA濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものをPCRの鋳型DNA試料とした。

【0063】

（2）小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、スターチスの種子と米（玄米）からのDNA抽出

DNeasy Plant Maxi Kit Handbookを参考にして、QIAGEN社製のDNeasy Plant Maxi Kitを用い、以下の方法で行った。

【0064】

細かく粉碎した試料2gを50ml容チューブに入れ、10mlのバッファー AP1、20 μ lのRNase A（100mg/ml）を加えて混合し、65℃で15分間保温した後、約3,000 \times gで10分間遠心分離した。得られた上清のうち4mlを15ml容チューブに回収し、そこに1.8mlのバッファー AP2を加えて、氷中で10分間放置した後、約3,000 \times gで10分間遠心分離した。得られた上清をQIAshredder Spin Columnに供し、約3,000 \times gで5分間遠心分離した。得られたパス液のうち5mlを50ml容チューブに回収し、そこに7.5mlのバッファー AP3/Eを加えて混合した後、DNeasy Spin Columnに供し、約3,000 \times gで5分間遠心分離してDNAをColumnに吸着させた。その後、Columnに12mlのバッファー AWを加え、約3,000 \times gで5分間遠心分離してColumnを洗浄、再度12mlのバッファー AWを加え、約3,000 \times gで10分間遠心分離してColumnを洗浄した。最終的に65℃で予め保温しておいた1mlのバッファー AEをColumnに加え、10分間放置後に約3,000 \times gで5分間遠心分離してColumnからDNAを溶出した。溶液中のDNA濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものをPCRの鋳型DNA試料

とした。

【0065】

(3) 落花生の種子からのDNA抽出:

QIAGEN Genomic DNA HandbookとNucleoSpin Extract 2 in 1 For Direct Purification of PCR Productsを参考にして、QIAGEN社製のDNeasy Plant Maxi KitとMACHEREY-NAGEL社製のNucleoSpin Extract 2 in 1を組合わせて用い、以下の方法で行った。

【0066】

細かく粉碎した試料1gを15ml容チューブに入れ、10mlのバッファー G2、100 μ lのProteinase K (20mg/ml)、10 μ lのRNase A (100mg/ml)を加え、混合した後、50℃で1時間保温した。その後、約3,000 \times gで10分間遠心分離し、その上清液を得た。得られた上清液を、予め1mlのバッファー QBTで平衡化したGenomic-tip 20/Gに供してDNAをColumnに吸着させた。その後、4mlのバッファーQCでColumnを洗浄し、予め50℃に加温してある1mlのバッファーQFで溶出させた。溶出液に4容量のバッファーNT2を加えて混合した後、二本のNucleoSpin Extract Columnに一回に650 μ lずつ供し、約6,000 \times gで1分間遠心分離してDNAをColumnに吸着させた。これを全液量処理するまで繰り返した。その後、Columnに600 μ lのバッファー NT3を加え、約6,000 \times gで1分間遠心分離してColumnを洗浄、再度600 μ lのバッファーNT3を加え、最高速度で1分間遠心分離して、Columnに残っているバッファーNT3を完全に除去した。最終的に100 μ lのバッファーNEをColumnに加えて、最高速度で1分間遠心分離してColumnから溶出し、イソプロパノール沈澱により回収した沈澱物を50 μ lの滅菌超純水に溶解した。溶液中のDNA濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものをPCRの鋳型DNA試料とした。

【0067】

(4) 小麦、大豆、とうもろこし、カラシ、ソバカズラの葉からのDNA抽出:

DNeasy Plant Mini Kit Handbookを参考にして、QIAGEN社製のDNeasy Plant Mini Kitを用い、以下の方法で行なった。

【0068】

細かく粉碎した試料0.5gを15ml容チューブに入れ、3mlのバッファー AP1、30

μ lのRNase A (100mg/ml) を加え、混合した後、65℃で15分間保温した。その後、これに975 μ lのバッファー AP2を加えて、氷中で10分間放置し、遠心分離によりその上清液を得た。得られた上清をQIAshredder Spin Columnに供し、遠心分離によりColumnのパス液を得た。このパス液に0.5容量のバッファー AP3、1容量のエタノールを加えて混合した後、二本のDNeasy Spin Columnに一回に650 μ lずつ供し、約6,000×gで1分間遠心分離してDNAをColumnに吸着させた。これを、全液量処理するまで繰り返した。その後、Columnに500 μ lのバッファーAWを加え、約6,000×gで1分間遠心分離してColumnを洗浄、再度500 μ lのバッファーAWをColumnに加え、最高速度で1分間遠心分離して、Columnに残っているバッファーAWを完全に除去した。最終的に65℃で予め保温しておいた120 μ lのバッファーAEをColumnに加え、約6,000×gで1分間遠心分離してColumnから溶出した。溶液中のDNA濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものをPCRの鋳型DNA試料とした。

【 0 0 6 9 】

C. ソバのITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列の一部を検出するPCR

(1) ソバ定性PCR用プライマー:

プライマー配列には、ソバ属に属する植物のGenBankに登録されている以下の21配列中のITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列に共通な配列を用いた。

- 1: *Fagopyrum urophyllum* (AB000342)
- 2: *Fagopyrum urophyllum* (AB000341)
- 3: *Fagopyrum tataricum* (sub#species:potanini) (AB000340)
- 4: *Fagopyrum tataricum* (AB000339)
- 5: *Fagopyrum statice* (AB000338)
- 6: *Fagopyrum statice* (AB000337)
- 7: *Fagopyrum pleioramosum* (AB000336)
- 8: *Fagopyrum lineare* (AB000335)
- 9: *Fagopyrum leptopodum* (AB000334)
- 10: *Fagopyrum homotropicum* (AB000333)
- 11: *Fagopyrum gracilipes* (AB000332)
- 12: *Fagopyrum esculentum ancestralis* (AB000331)

- 13: *Fagopyrum esculentum* (AB000330)
- 14: *Fagopyrum cymosum* (AB000329)
- 15: *Fagopyrum cymosum* (AB000328)
- 16: *Fagopyrum cymosum* (AB000327)
- 17: *Fagopyrum cymosum* (AB000326)
- 18: *Fagopyrum cymosum* (AB000325)
- 19: *Fagopyrum cymosum* (AB000324)
- 20: *Fagopyrum capillatum* (AB000323)
- 21: *Fagopyrum callianthum* (AB000322)

【 0 0 7 0 】

そして、下記配列のオリゴDNAプライマー（株式会社QIAGEN社製 OPC精製品）を合成して、ソバITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列の一部を検出するPCR（以下、ソバ定性PCRとする）用プライマーとして使用した。

5' - CGC CAA GGA CCA CGA ACA GAA G - 3' （配列番号 1 4）

5' - CGT TGC CGA GAG TCG TTC TGT TT - 3' （配列番号 1 5）

【 0 0 7 1 】

（ 2 ） ソバ定性PCR用プライマーの特異性（PCRシミュレーション）：

PCRシミュレーションソフトAmplify 1.0 (Bill Engels) により、ソバ属に属する植物の21配列、ソバ以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の8配列（落花生、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、リンゴ、オレンジ）、食品原材料としてよく使われている植物の4配列（とうもろこし、米、胡椒、カラシ）、ソバ近縁種の植物の27配列から、ソバ定性PCR用プライマーでPCR増幅産物が得られるシミュレーション結果となるかを確認した。ここでいうソバ近縁種の植物とは、GenBankに登録されている普通ソバ*Fagopyrum esculentum*の塩基配列（AB000330）のITS-1配列部分をBLASTホモロジー検索に供して、Score 60 bits以上となったソバ属以外の植物のことである。今回は、さらにその植物が属する属の中で最もScoreが高い値となった種の配列を、その属の代表の配列として選定した。なお、PCRシミュレーションはそれら配列のITS-1～5.8S rRNA遺伝子～ITS-2配列の領域に対して行った。シミュレーションに用いた配列のGenBank Accession Numberなら

びに、シミュレーション結果を表1A～1Cに示す。表1A～1Cの省略文字、記号は以下に示す通りである：

黒星印：標的サイズ付近（±10bp）のPCR増幅産物が得られると予想されたもの

W値：PCR増幅産物の得られる可能性

得られる可能性が高い…W6>W5>W4>W3>W2…得られる可能性が低い

数値（bp）：PCR増幅産物のサイズ（bp）

Amplifyで得られた値から2を引いた値

—：PCR増幅産物なしと予想されたもの

【0072】

【表1A】

そば定性 PCR 用プライマー： Amplify 産物						
学名 (一般名)	GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
★ <i>Fagopyrum urophyllum</i>	AB000342	101bp	—	439bp	—	—
★ <i>Fagopyrum urophyllum</i>	AB000341	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum tataricum</i> (ダツタンそば)	AB000340	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum tataricum</i> (ダツタンそば)	AB000339	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum statice</i>	AB000338	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum statice</i>	AB000337	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum pleioramosum</i>	AB000336	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum lineare</i>	AB000335	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum leptopodum</i>	AB000334	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum homotropicum</i>	AB000333	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum gracilipes</i>	AB000332	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum esculentum</i> (普通そば)	AB000331	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum esculentum</i> (普通そば)	AB000330	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000329	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000328	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000327	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000326	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000325	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum cymosum</i>	AB000324	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum capillatum</i>	AB000323	101bp	—	—	—	—
★ <i>Fagopyrum callianthum</i>	AB000322	101bp	—	440bp	—	—

【0073】

【表 1 B】

そば定性 PCR 用プライマー : Amplify 産物							
学名 (一般名)		GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
アレルギー 特定原材料	<i>Arachis hypogaea</i> (落花生)	AF156675	—	—	—	—	—
	<i>Triticum aestivum</i> (小麦)	AJ301799	—	—	—	—	—
	<i>Glycine max</i> (大豆)	U60551	—	—	—	—	—
	<i>Juglans regia</i> (クルミ)	AF303809	—	—	—	—	—
	<i>Tricholoma matsutake</i> (松茸)	U62964	—	—	—	—	—
	<i>Prunus persica</i> (桃)	AF185621	—	—	—	—	—
	<i>Malus x domestica</i> (リンゴ)	AF186484	—	—	—	—	—
	<i>Citrus sp.</i> (パレンシアオレンジ)	E08821	—	—	—	—	—
主要食品原料	<i>Zea mays</i> (とうもろこし)	U46648	—	—	—	—	—
	<i>Oryza sativa</i> (米)	AF169230	—	—	—	—	—
	<i>Piper nigrum</i> (胡椒)	AF275197	—	—	—	—	—
	<i>Sinapis alba</i> (からし)	X15915	—	—	—	—	—
タデ科の 近縁種	<i>Aconogonum sp. Won 152</i>	AF189731	—	—	—	—	—
	<i>Fallopia scandens</i>	AF040069	—	—	—	—	—
	<i>Polygonum virginianum</i>	U51274	—	—	—	—	—
	<i>Rumex acetosella</i>	AF189730	—	—	—	—	—

【 0 0 7 4 】

【表 1 C】

そば定性 PCR 用プライマー : Amplify 産物						
学名 (一般名)	GenBank Accession No.	W6	W5	W4	W3	W2
<i>Talinum paraguayense</i>	L78056	—	—	—	—	—
<i>Bruinsmia styracoides</i>	AF396438	—	—	—	—	—
<i>Talinella pachypoda</i>	L78054	—	—	—	—	—
<i>Rehderodendron kwangtungense</i>	AF396448	—	—	—	—	—
<i>Pterostyrax corymbosus</i>	AF396445	—	—	—	—	—
<i>Anredera cordifolia</i>	L78086	—	—	—	—	—
<i>Cistanthe quadripetala</i>	L78062	—	—	—	—	—
<i>Xenia vulcanensis</i>	L78060	—	—	—	—	—
タデ科以外の近縁種 <i>Talinopsis frutescens</i>	L78058	—	—	—	—	—
<i>Talinaria palmeri</i>	L78052	—	—	—	—	—
<i>Portulaca sp.</i>	L78049	—	—	—	—	—
<i>Phemeranthus confertiflorus</i>	L78039	—	—	—	—	—
<i>Montiopsis umbellata</i>	L78033	—	—	—	—	—
<i>Grahamia bracteata</i>	L78028	—	—	—	—	—
<i>Herniaria glabra</i>	AJ310965	—	—	—	—	—
<i>Alhauudia dumosa</i>	L78011	—	—	—	—	—
<i>Sinojackia xylocarpa</i>	AF396451	—	—	—	—	—
<i>Halesia macgregori</i>	AF396442	—	—	—	—	—
<i>Changiostyrax dolichocarpa</i>	AF396439	—	—	—	—	—
<i>Alectryon subdentatus</i>	AF314765	—	—	—	—	—
<i>Anacampseros recurvata</i>	L78014	—	—	—	—	—
<i>Weinmannia racemosa</i>	AF485597	—	—	—	—	—
<i>Bursera tecomaca</i>	AF080029	—	—	—	—	—

【0075】

シミュレーションの結果、表1A～1Cに示す通り、ソバ属の21配列からは標的とした101bpのサイズのPCR増幅産物が得られることが予想された。また、ソバ属以外のアレルギーを起こす恐れのある植物の8配列（落花生、小麦、大豆、クルミ、松茸、桃、リンゴ、オレンジ）、食品原材料としてよく使われている植物の4配列（とうもろこし、米、胡椒、カラシ）、ソバ近縁種の植物の27配列からは、標的サイズのPCR増幅産物ならびに非特異的なPCR増幅産物は得られないことが予想された。

【0076】

(3) ソバ定性PCR:

QIAGEN社製のHotStarTaq Master Mix Kitを用い、以下の方法で行った。

12.5 μ l の2×HotStartTaq Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase、PCR バッファー with 3mM MgCl₂、400 μ M each dNTP) に、配列番号 14 と配列番号 15 のプライマーをそれぞれ終濃度で0.5 μ Mずつ、及び鋳型DNAを加え、最終的に滅菌超純水で25 μ lとした反応用溶液を0.2mlマイクロチューブに入れ、Applied Biosystems社製のサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9600により、95℃、15分（酵素活性化）の後、95℃、1分（変性）、66℃、2分（アニーリング）、72℃、1分（伸長）のサイクルを45回繰り返した後、72℃、4分（最終伸長）として反応させた。得られたPCR反応液をエチジウムブロマイド含有の2%アガロースゲル電気泳動に供して、Amersham Biosciences株式会社製の蛍光イメージアナライザーFluorImager 595により解析した。その結果を図1A、1Bと図2に示す。図1A、1Bと図2の省略文字、記号などは以下に示す通りである：

M : 100bp DNA Ladder Marker

(一) : 鋳型DNA未添加

数字 : 添加した鋳型DNA量

矢印 : 標的のPCR増幅産物のバンド（約101bp）。

【0077】

なお、抽出した植物DNAがPCR増幅可能なレベルの純度であることは、植物chloroplast DNAの一部を増幅するプライマーにより、PCR増幅産物が得られることで確認した（データ省略）。

【0078】

(4) ソバ定性PCRの感度と特異性：

ソバ定性PCRの結果、図1A、1Bに示す通り、白花ソバ（普通ソバ）とダッタンソバDNA 500～50fgから標的としたソバITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列から予想される約101bpのサイズのPCR増幅産物が得られた。500～50fgのソバDNAを検出できる感度とは、ある試料から抽出したDNA 50ngを鋳型としてPCRを行った場合、その試料DNA中に含まれる10～1ppmのソバDNAを検出できるレベルの感度に相当する。

【0079】

ソバ定性PCRの結果、図2に示す通り、小麦の葉、落花生の種子、大豆の葉、とうもろこしの葉、カラシの葉、白胡椒、米DNA 50ngからは標的サイズのPCR増幅産物ならびに非特異的なPCR増幅産物は得られなかった。サケ精子DNAからも同様にPCR増幅産物は得られないことを確認した（データ省略）。さらに、図2に示す通り、ソバ近縁種の一つであるソバカズラの葉DNAについては、50～5ngでは非常に薄いながら標的サイズのPCR増幅産物が得られたものの、500pg以下では標的サイズのPCR増幅産物ならびに非特異的なPCR増幅産物は得られなかった。500pg以下のソバカズラDNAを偽陽性で検出しない特異性とは、ある試料から抽出したDNA 50ngを鋳型としてPCRした場合、その試料DNA中に1%以下のソバカズラDNAが存在していたとしても、それが偽陽性として検出されないレベルの特異性に相当する。また、PCR条件を変更することで、ソバカズラDNA 50～5ngからも標的サイズの産物が得られなくなる可能性もある。

【0080】

(5) ソバ定性PCR増幅産物の塩基配列解析:

上記で得られた白花ソバDNA由来のPCR増幅産物の塩基配列は、配列番号14と配列番号15のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。得られた塩基配列を、GenBankに登録されている普通ソバ*Fagopyrum esculentum*の塩基配列（AB000330）と比較し、白花ソバDNA由来のPCR増幅産物の塩基配列は、GenBankに登録されている普通ソバ（*Fagopyrum esculentum*）の塩基配列（AB000330）の標的とした部分と100%合致することを確認した。このことから、上記プライマーを用いたPCRにより、ソバITS-1～5.8S rRNA遺伝子の一部の配列を増幅、検出していることが立証された。

【0081】

以上の結果より、上記プライマーを用いたソバ定性PCRにより、ソバ属に属する植物全般のITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列を、高感度かつ、特異的に検出できることが明らかとなった。本プライマーを、ソバITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列のコピー数を定量するPCR（以下、ソバ配列の定量的PCR法とする）に用いることとした。

【0082】

D. スターチスITS-1配列の一部を検出するPCR (補正用)

次に、補正に用いる標準植物由来の試料のPCRによる検出について検討した。

本実施例においては、日本雑草学会の畑地雑草のリストにはない種子植物であって、種子の入手が容易であるスターチスを標準植物由来の試料として用いた。

【0083】(1) スターチス定性PCR用プライマー:

GenBankに登録されているスターチスのDNA配列 (AJ222860) を基に、下記配列のスターチスITS-1配列の一部を検出するPCR (以下、スターチス定性PCRとする) 用プライマーを設計し、オリゴDNAプライマー (株式会社QIAGEN社製 OPC精製品) を合成した。

5'-TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC-3' (配列番号 57)

5'-CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT-3' (配列番号 58)

【0084】(2) スターチス定性PCR:

上記プライマーをそれぞれ終濃度で0.2 μ Mずつ用いたこと以外は、基本的に上記実施例1. C. (3) と同じ方法で行った。その結果を図3と図4に示す。

なお、抽出した植物DNAがPCR増幅可能なレベルの純度であることは、植物chloroplast DNAの一部を増幅するプライマーにより、PCR増幅産物が得られることで確認した (データ省略)。

【0085】(3) スターチス定性PCR用プライマーの特異性:

スターチス定性PCRの結果、図3に示す通り、スターチスの種子DNA 50ngから標的としたスターチスITS-1配列から予想される約101bpのサイズのPCR増幅産物が得られた。また、白花ソバ、ダットンソバの種子、小麦の種子、落花生の種子、大豆の種子、とうもろこしの種子、カラシの種子、白胡椒、米、ソバカズラの葉DNA 50ngからは標的サイズのPCR増幅産物ならびに非特異的なPCR増幅産物は得られなかった。サケ精子DNAからも同様にPCR増幅産物は得られないことを確認した (データ省略)。

したがって、上記スターチスDNA検出用のプライマーは、スターチスDNAに対す

る特異性を有していると推測される。

【0086】

(4) 食品原材料へのスターチス混入の有無の評価:

次に、スターチスが標準植物由来の試料として適切であることを確認する。すなわち、食品または食品原材料中に混入していないことを確認するため、スターチス定性PCRを行った。

スターチス定性PCRの結果、図4に示す通り、5種類の小麦粉、5種類のコーングリッツ、3種類のカラシの種子DNA 50ngからは標的サイズのPCR増幅産物ならびに非特異的なPCR増幅産物は得られなかった。

【0087】

(5) スターチスへのソバ混入の有無の評価:

スターチスの種子の試料中に、ソバが混入していないか否かを確認するために、後述の通りに確立したソバ配列の定量的PCR法で確認した。ソバ配列の定量的PCR法の結果、スターチスの種子DNAからは増幅を示す蛍光シグナルの立上がりはみられず、混入は認められないことを確認した（データ省略）。

【0088】

(6) スターチス定性PCR増幅産物の塩基配列解析:

上記で得られたスターチスDNA由来のPCR増幅産物の塩基配列は、配列番号57と配列番号58のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンシングにより解析した。なお、得られた塩基配列を、GenBankに登録されているスターチス *Limonium sinuatum* の塩基配列 (AJ222860) と比較し、スターチスDNA由来のPCR増幅産物の塩基配列は、GenBankに登録されているスターチス *Limonium sinuatum* の塩基配列 (AJ222860) の標的とした部分と100%合致することが確認された。スターチス定性PCRにより、標的とした、スターチスITS-1の一部の配列を増幅、検出していることが確認できた。

【0089】

以上の結果より、スターチスは、食品原材料との相互混入がなく、補正用の標準植物由来の試料として適切であることが示唆された。そこで、配列番号57と配列番号58のプライマーを、スターチスITS-1配列のコピー数を定量するPCR（

以下、スターチス配列の定量的PCR法とする) に用いることとした。

【0090】

E. 定量解析に用いる検量線用プラスミドの作製

(1) ソバとスターチス定性PCRの標的DNA配列の連結PCRと連結PCR増幅産物の塩基配列解析:

ソバ標的増幅産物とスターチス標的増幅産物をPCR法により連結し、TA クローニングベクターに導入して大腸菌に形質転換して増幅させることにより、ソバとスターチスのコピー数を定量解析するための検量線用プラスミドを作製した。

【0091】

まず、下記配列のオリゴDNAプライマー (株式会社QIAGEN社製 OPC精製品) を合成してプライマーとして使用した。これらのプライマーは、上述のソバとスターチス定性PCRに用いたソバおよびスターチスのプライマー部位を含んでいる。

5'-TCT AGA CGC CAA GGA CCA CGA ACA GAA G-3' (配列番号60)

5'-CAA AAG CTT CGT TGC CGA GAG TCG TTC TGT TT-3' (配列番号61)

5'-ACG AAG CTT TTG GAC GTG TAT CCC TTG TGG TTC-3' (配列番号62)

5'-GGA TCC CAC GAA GGT GAA AGT TGC GTT CAT-3' (配列番号63)。

【0092】

Jayaraman Kら (1992. A PCR-Mediated Gene Synthesis Strategy Involving the Assembly of Oligonucleotides Representing Only One of the Strands. BioTechniques 12: 392-398) の方法を参考にして、QIAGEN社製のHotStarTaq Master Mix Kitを用いて以下の方法により、連結プラスミドを作製した。

【0093】

25 μ lの2 \times HotStartTaq Master Mix (HotStar Taq DNA Polymerase、3mM MgCl₂含有PCRバッファー、400 μ M 各dNTP) に、さらにdNTPを終濃度で500 μ Mとなるように加え、配列番号60と配列番号63をアウタープライマーとしてそれぞれ終濃度で1.0 μ Mずつ、配列番号61と配列番号62をブリッジプライマーとしてそれぞれ終濃度で25nMずつ加え、さらに、鋳型DNAとして実施例1. C. (4) で得られたソバ定性PCRの標的DNA配列を持つPCR増幅産物と実施例1. D. (3) で得られたスターチス定性PCRの標的DNA配列を持つPCR増幅産物を加え、最終

的に滅菌超純水で50 μ lとした反応用溶液を0.2mlマイクロチューブに入れ、MJ Research社製のサーマルサイクラーPTC-200 DNA Engineにより、95℃, 15分（酵素活性化）の後、95℃, 1分（変性）、40℃, 1分（アニーリング）、72℃, 1分（伸長）のサイクルを15回繰り返す、さらに95℃, 1分（変性）、66℃, 1分（アニーリング）、72℃, 1分（伸長）のサイクルを30回繰り返して反応させた。得られたPCR反応液をエチジウムブロマイド含有の2%アガロースゲル電気泳動に供して、アマシャムバイオサイエンス株式会社製の蛍光イメージアナライザーFluorImager 595により解析した。なお、得られたPCR増幅産物の塩基配列は、配列番号60と配列番号63のプライマーを用いた両鎖ダイレクトシーケンスにより解析した。

【0094】

連結PCRの結果、予想された約220bpのPCR増幅産物が得られた（データ省略）。塩基配列解析の結果、このPCR増幅産物には、ソバとスターチス定性PCRの標的DNA配列が含まれていることが確認できた（データ省略）。

【0095】

（2）連結PCR増幅産物のプラスミドへの導入と導入DNA断片の塩基配列解析：

上記で得られたPCR増幅産物を、pGEM-T Easy Vector System（Promega社製）を用いてpGEM-T Easy VectorにTA cloningし、大腸菌（E. coli JM109（DH5 α ））に形質転換した。コロニーPCRならびに塩基配列解析によりソバとスターチス定性PCRの標的DNA配列が含まれていることが確認できた約220bpの導入断片を持つ形質転換体をLB培地で液体培養して、菌体からQIAGEN社製のQIAGEN Hi Speed Plasmid Midi Kitを用いてプラスミドを抽出、精製した。なお、精製したプラスミドに導入されたDNA断片の塩基配列は、プラスミド上にある配列のプライマーを用いた両鎖シーケンスにより解析した結果、意図した通り、形質転換体のプラスミドに導入されたDNA断片の塩基配列には、ソバとスターチス定性PCRの標的DNA配列が含まれていることが確認できた（データ省略）。

【0096】

（3）検量線用プラスミドの希釈系列の調製：

プラスミドの長さ、上記で抽出、精製したプラスミドの吸光値（Abs. 260nm

）から、プラスミドの分子数（コピー数）を計算した。5ng/ μ lのサケ精子DNA（和光純薬社製 デオキシリボ核酸ナトリウム サケ精巢製 繊維状を滅菌超純水に溶解したもの）でプラスミドを希釈して、 $10^9 \sim 10^1$ コピー/ 2.5μ lの検量線用プラスミド希釈系列を作製した。これを、ソバとスターチス配列の定量的PCR法の検量線作成に用いることとした。

【0097】

F. ソバ配列のコピー数を定量するPCR

(1) ソバ配列の定量的PCR法用TaqMan MGBプローブ:

下記配列のTaqMan MGBプローブ（Applied Biosystems Japan株式会社製 リポーター色素FAM）を合成して、ソバ配列の定量的PCR法用プローブとして使用した。なお、プローブ配列には、ソバ属に属する植物のITS-1～5.8S rRNA遺伝子配列としてGenBankに登録されている21配列に共通な配列を用いた。

5'-CGG GAC GCG CTT C-3'（配列番号64）

【0098】

(2) ソバ配列の定量的PCR法:

QIAGEN社製のQuantiTect Probe PCR Kitを用い、以下の方法で行った。

12.5 μ lの2×QuantiTect Probe PCR Master Mixに、配列番号14と配列番号15のプライマーを終濃度でそれぞれ0.2 μ Mずつと、配列番号64のTaqMan MGBプローブを終濃度で0.2 μ M、及び鋳型DNAを加え、最終的に滅菌超純水で25 μ lとした溶液を96穴PCRプレートに分注した。なお、検量線用としては、鋳型DNAの代わりに、検量線用プラスミドDNAの希釈系列を加えた溶液を分注した。分注した96穴PCRプレートを、Applied Biosystems社製のReal Time PCR装置Sequence Detection System 7700にセットし、50℃、2分、95℃、15分の後、95℃、1分（変性）、66℃、2分（アニーリング）、72℃、1分（伸長）のサイクルを45回繰り返して反応させた。反応は全て同一試料を2ウェル並行で行なった。反応終了後、伸長ステップにおける蛍光データを解析した。なお、ベースラインは、始めに0-1サイクルに設定して蛍光の立ち上がりの始まるサイクルを確認して、そのサイクルよりも前の範囲で適宜設定した。また、閾値ライン（Threshold Line）の設定は、Kuribara H et al. 2002. Novel Reference Molecules for Quantitation of

Genetically Modified Maize and Soybean. Journal of AOAC International 85: 1077-1089に記載の方法に従って行なった。その結果を図 5 A および B、図 6、図 7 と図 8 に示す。

【 0 0 9 9 】

なお、抽出した植物DNAがPCR増幅可能なレベルの純度であることは、植物クロロプラストDNAの一部を増幅するプライマーにより、PCR増幅産物が得られることで確認した（データ省略）。

【 0 1 0 0 】

(3) ソバ配列の定量的PCR法の特異性：

ソバ配列の定量的PCR法の結果、図 5 A および B に示す通り、白花ソバの種子DNAから増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが確認された。一方、小麦の葉、落花生の種子、大豆の葉、とうもろこしの葉、カラシの葉、白胡椒、米、スターチスの種子DNA 50ngからは増幅を示す蛍光シグナルの立上がりは認められなかった。サケ精子DNAからも増幅を示す蛍光シグナルの立上がりは認められなかった。

（データ省略）なお、図 6 に示す通り、ソバカズラの葉DNA 50ngで増幅シグナルの立ち上がりはみられたものの、その立ち上がりは検量線の10copyよりも遅い立ち上がりサイクル数（Ct値）、かつThreshold Lineにかからなかった。

【 0 1 0 1 】

この特異性は、ある試料にスターチスを添加したものから抽出したDNA 50ngを鋳型としてPCRを行った場合、その試料が100%食用ではない雑草の一種のソバカズラ（ソバ近縁種）であったとしても、それが偽陽性として定量されないレベルに相当する。

【 0 1 0 2 】

(4) ソバ配列の定量的PCR法の定量性と感度：

ソバ配列の定量的PCR法の結果、図 7 と図 8 に示す通り、 $10^8 \sim 10^1$ コピーの検量線用プラスミドで、相関係数0.999、かつ傾き-3.504の検量線を引くことができる定量性と感度を確認できた。また、白花ソバDNA 50fgからも増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりがみられる感度を確認でき、さらには白花ソバDNA 5ng～50fgのCt値をプロットすると、この範囲でも相関のある直線を引くことができる

定量性を確認できた（データ省略）。

【0103】

以上の結果より、配列番号14と配列番号15のプライマー、配列番号64のプロープを用いたソバ配列の定量的PCR法により、ソバ属に属する植物全般のITS-1~5.8S rRNA遺伝子配列を高感度かつ特異的に検出し、そのコピー数を定量できることが明らかとなった。本ソバ配列の定量的PCR法と次に示す補正用のスターチス配列の定量的PCR法と組合わせて、ソバの混入量測定に用いることとした。

【0104】

G. スターチス配列のコピー数を定量するPCR

(1) スターチス配列の定量的PCR法用TaqMan MGBプロープ:

下記配列のTaqMan MGBプロープ（Applied Biosystems Japan株式会社製 リポーター色素FAM）を合成して、スターチス配列の定量的PCR法用プロープとして使用した。

5'-TGT GCG ACG CGG AAT G-3'（配列番号59）

【0105】

(2) スターチス配列の定量的PCR法と解析:

配列番号57と配列番号58のプライマーをそれぞれ終濃度で0.2μMずつ用いたこと、配列番号59のTaqMan MGBプロープを終濃度で0.2μM用いたこと以外は、基本的に実施例1.のF.（2）と同じ方法で行なった。その結果を図9、図10と図11に示す。

【0106】

(3) スターチス配列の定量的PCR法の特異性:

スターチス配列の定量的PCR法の結果、図9に示す通り、スターチスの種子DNAから増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが見られた。一方、白花ソバとダットンソバの種子、小麦の種子、落花生の種子、大豆の種子、とうもろこしの種子、カラシの種子、白胡椒、米、ソバカズラの葉DNA 50ngからは増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりが見られなかった。サケ精子DNAからも増幅を示す蛍光シグナルの立ち上がりはみられなかった（データ省略）。

【0107】

(4) スターチス配列の定量的PCR法の定量性:

スターチス配列の定量的PCR法の結果、図10と図11に示す通り、 $10^8 \sim 10^1$ コピーの検量線用プラスミドで、相関係数0.999、かつ傾き-3.386の検量線を引くことができる定量性を確認できた。

【0108】

以上の結果より、配列番号57と配列番号58のプライマー、配列番号59のプロープを用いたスターチス配列の定量的PCR法により、スターチスのITS-1配列を特異的に検出し、そのコピー数を定量できることが明らかとなった。補正用の本スターチス配列の定量的PCR法と実施例1. F. に示したソバ配列の定量的PCR法と組合わせて、ソバの混入量測定に用いることとした。

【0109】

実施例2

A. 標準としたスターチスと、各種ソバ粉、擬似混入試料の作製に用いたソバ、米、小麦

(1) スターチス:

サカタのタネより販売されている切花用エキセレントライトブルー（単一ロット品）を用いた。

(2) ソバ:

タカノ株式会社より販売されている白花ソバ（普通ソバ *Fagopyrum esculentum* : 2倍体）のソバ粉、ダツタンソバ（*F. tataricum* : 2倍体）のソバ粉、高嶺ルビー（*F. esculentum* : 2倍体）のソバ粉、グレートルビー（*F. esculentum* : 4倍体）のソバ粉を用いた。なお、擬似混入試料の作製には、白花ソバ粉を用いた。

(3) 小麦:

市販の農林61号を用いた。

(4) 米:

市販の秋田小町の無農薬玄米を用いた。

【0110】

B. 標準としたスターチスと、擬似混入試料の作製に用いた米、小麦の粉碎とDN

A抽出

(1) 粉碎:

粉碎は、Retsch社製の超遠心粉碎機Ultra Centrifugal Mill ZM1にロータ（ステンレス鋼製24本刃）とスクリーン（ステンレス鋼製0.20mm）をセットして行った。

【0111】

(2) 粉碎機の洗浄:

試料の粉碎前と後に、粉碎機の試料受け皿、試料蓋、ロータ、スクリーン、とめ具類、治具などの部品は、水洗浄、10%ブリーチ溶液に浸漬、水洗浄、乾燥して使用した。粉碎機の本体部分は、エアガン洗浄、拭き掃除して使用した。

【0112】

(3) 粉碎機にソバとスターチス汚染がないことの確認:

大量粉碎前に、その試料の一部、あるいはソバやスターチスの混入が無い市販の皮付きとうもろこしを凍結乾燥したものを粉碎して、そこからDNAを抽出し、実施例1. F. と G. に記載のソバ配列やスターチス配列の定量的PCR法で、50ngの鋳型DNAから増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルの有無を確認した。蛍光シグナルがなかった場合には汚染がないと判断して、以下の大量粉碎に進んだ。蛍光シグナルがあった場合には汚染があると判断して、粉碎機を再度洗浄し、ソバやスターチスの混入が無いことを確認済みの玄米（1kg）を当該粉碎機で粉碎した後、洗浄するとともに新品スクリーンに交換を行った後、再度上記ソバやスターチスの混入が無い市販の皮付きとうもろこしを凍結乾燥したものを粉碎し、同様の方法で蛍光シグナルの有無を確認し、粉碎機にソバとスターチスの汚染がないと判断できた上で、以下の大量粉碎に進んだ。

【0113】

(4) スターチスの大量粉碎と、その粉碎物にソバの混入がないことの確認:

ソバの汚染が無いことを確認した粉碎機で、約1kgのスターチスを粉碎した。粉碎物から2gずつ10点サンプリングして、実施例1. B. (2) に記載の方法でDNeasy Plant Maxi KitによりDNAを抽出し、ソバ配列の定量的PCR法で、50ngの鋳型DNAから増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルがないことを確認した（デー

タ省略)。これにより、ソバの混入がない、スターチスの粉碎物を確保した。

【0114】

(5) 米、小麦の大量粉碎と、それらの粉碎物にソバとスターチスの汚染がないことの確認:

ソバとスターチスの汚染が無いことを確認した粉碎機で、約500gの米を粉碎した。粉碎物から2gずつ5点サンプリングして、実施例1. B. (2)に記載の方法でDNeasy Plant Maxi KitによりDNAを抽出し、ソバ配列とスターチス配列の定量的PCR法で、50ngの鋳型DNAから増幅の立ち上がりを示す蛍光シグナルがないことを確認した(データ省略)。小麦も同様にして行った。これにより、ソバとスターチスの混入がない、米、小麦の粉碎物を確保した。

【0115】

C. 擬似混入試料の作製

(1) ソバ粉／米の粉碎物の擬似混入試料:

静防OP [特殊静防処理] PZタイプ (三方チャック袋) の号数No.6 (福助工業株式会社) に、米の粉碎物45.00gをはかり込んだものを6個準備して、No. 1~6の番号を付けた。ソバ粉5.00gをNo. 1の袋にはかり込み、袋の口を閉じて手で15分間混合して、10%のソバ粉を含む米の粉碎物を得た。続いて、この10% (100,000ppm) のソバ粉を含む米の粉碎物5.00gをNo. 2の袋にはかり込み、袋の口を閉じて手で15分間混合して、1% (10,000ppm) のソバ粉を含む米の粉碎物を得た。この希釈、混合操作を繰り返し、100,000~1ppmのソバ粉を含む米の粉碎物を作製した。

【0116】

(2) ソバ粉／小麦の粉碎物の擬似混入試料:

同様にして、100,000~1ppmのソバ粉を含む小麦の粉碎物を作製した。

(3) ソバ粉／米と小麦の粉碎物の擬似混入試料:

静防OP [特殊静防処理] PZタイプ (三方チャック袋) の号数No.5 (福助工業株式会社) に、10ppmのソバ粉を含む米の粉碎物12.5gと10ppmのソバ粉を含む小麦の粉碎物12.5gをはかり込み、袋の口を閉じて手で15分間混合して、10ppmのソバ粉を含む米と小麦の粉碎物を作製した。

【0117】

D. DNA抽出時の擬似混入試料サンプリングスケールの決定(1) 白花ソバ粉の粒度分布測定：

ソバ粉を球と仮定した時の粒径を求めるため、白花ソバ粉の粒度分布測定（レーザー回折・散乱法・乾式、圧力 $0.5\text{kg}/\text{cm}^2$ の条件）を行なった。測定は、粉株式会社セイシン企業の粉体測定技術センターに依頼した。結果、白花ソバ粉の累積50%の粒径（X50）は $80.941\mu\text{m}$ となった。

(2) 白花ソバ粉のカサ密度測定：

ソバ粉の密度（粉の内部にある空壁を含めた密度）を求めるため、白花ソバ粉のカサ密度測定（Hg法・一定体積のセルにソバ粉を入れた後に水銀でセルを満たす方法）を行った。測定は、粉株式会社セイシン企業の粉体測定技術センターに依頼した。結果、白花ソバ粉のカサ密度（水銀法）は $1.181\text{g}/\text{cm}^3$ となった。

ソバ粉の占める体積 = (セルの体積) - (入れた水銀の体積)

ソバ粉のカサ密度（水銀法） = (入れたソバ粉の重量) / (ソバ粉の占める体積)

(3) 擬似混入試料中のソバ粉粒数の試算とサンプリングスケールの決定：

白花ソバ粉の粒径 $80.941\mu\text{m}$ と密度 $1.181\text{g}/\text{cm}^3$ の測定値から、ソバ粉一粒あたりの重さを計算し、種々のソバ粉濃度の擬似混入試料中に存在するソバ粉の粒数を試算した。結果を表2に示す。今回、定量の目標とした混入量10ppmのソバを含む擬似混入試料からDNA抽出のための試料をサンプリングする場合、サンプリングした試料の中に最低でも100粒程度のソバ粉が入る様にしようとすると、サンプリング量は4g以上必要ということがわかった。DNA抽出には5gサンプリングすることとした。

【0118】

【表2】

擬似混入試料中の白花そば粉の粒子数

擬似混入試料中の 白花そば粉濃度 (ppm: μ g/g)	擬似混入試料をNgサンプリングした時の 白花そば粉の粒子数(そば粉一粒0.3277 μ gで計算)			
	N(g) =	2	4	5
1,000,000 ppm		3,051,167	12,204,669	15,255,836
100,000 ppm		305,117	1,220,467	1,525,584
10,000 ppm		30,512	122,047	152,558
1,000 ppm		3,051	12,205	15,256
100 ppm		305	1,220	1,526
10 ppm		31	122	153
1 ppm		3	12	15
				100粒以上

【0119】

E. 100%ソバ粉+スターチス標準、擬似混入試料+スターチス標準からのDNA抽出

(1) 各種ソバ粉試料:

白花ソバ粉を6点、高値ルビーソバ粉、グレートルビーソバ粉、ダットンソバ粉をそれぞれ3点サンプリングしてDNA抽出に用いた。

(2) 擬似混入試料:

100ppm白花ソバ粉/小麦の粉碎物、10ppm白花ソバ粉/小麦の粉碎物、10ppm白花ソバ粉/米の粉碎物、10ppm白花ソバ粉/小麦と米の粉碎物をそれぞれ3点サンプリングして、DNA抽出に用いた。

【0120】

(3) DNA抽出:

QIAGEN Genomic DNA HandbookやUser-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from plants using the QIAGEN Genomic-tipを参考にして、QIAGEN社製のGenomic-tipを用い、以下の方法で行った。

試料5gとスターチス粉碎物1gを50ml容チューブに入れ、30mlのCarlson Lysis バッファー (0.1M Tris-HCl (pH 9.5)、2% CTAB、1.4M Polyethylene Glycol #

6000、20mM EDTA)、60 μ lのRNase A (100mg/ml)、75 μ lの2-メルカプトエタノール、600 μ lのプロテイナーゼK (20mg/ml) を加え、さらに試料の分散性を高めるためにジルコニアボール (株式会社ニッカトー社製 YTZボール ϕ 7mm) 3つを入れてシェーカー (イワキ産業株式会社製 KM Shaker V-DX) で10分以上ダマが無くなるまで混合 (SPEED 100) した後、74℃で20分間保温した。なお、保温中は5分おきにチューブを手で振って混合した。

3,000 \times gで10分間遠心分離した後、15ml容チューブに上清を4mlとり、5mlのフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25：24：1) を加えて良く混合した。これを、3,000 \times gで10分間遠心分離した後、15ml容チューブに上清 (水層) をとり、3.5mlのクロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) を加えて良く混合した。これを、3,000 \times gで10分間遠心分離した後、15ml容チューブに上清 (水層) をとり、再度クロロホルム：イソアミルアルコール (24：1) 抽出と遠心分離を行い、上清 (水層) を回収した。上清 (水層) のうちの150 μ lからイソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を100 μ lの滅菌超純水に溶解した後、900 μ lのバッファー QBTを加えたものを、予め1mlのバッファー QBTで平衡化したGenomic-tip 20/Gに供してDNAをカラムに吸着させた。その後、4mlのバッファー QCでカラムを洗浄した。最終的に1mlのバッファー QFでDNA溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を40 μ lの滅菌超純水に溶解した。溶液中のDNA濃度を測定し、適宜滅菌超純水で希釈したものをPCRの鋳型DNA試料とした。

【0121】

F. スターチス標準を添加した100%ソバ粉から抽出したDNA中の「スターチス配列のコピー数／ソバ配列のコピー数比」の算出

ソバ配列とスターチス配列の定量的PCR法は、実施例1. のF. とG. に記載の方法で行なった。検量線をもとに、スターチス標準を添加した100%ソバ粉から抽出したDNA 50ng中のソバ配列のコピー数と、スターチス配列のコピー数を定量した。その定量値をもとに、「スターチス配列のコピー数／ソバ配列のコピー数＝Lo/Fo比」を算出した。なお、各ソバ粉のLo/Fo比は、同一サンプルを2ウェル並行で測定し、測定を二回繰り返して得られた比を平均して算出した。

【0122】

Lo/Fo比測定の結果、表3に示す通り、白花そば粉2.36（6点抽出、各点2ウェル測定、測定2回）、高嶺ルビーそば粉3.25、グレートルビーそば粉2.70、ダッタンそば粉4.75（3点抽出、各点2ウェル測定、測定2回）となった。ここで得られた白花そば粉のLo/Fo比と、実施例2．G．で算出した擬似混入試料の「ソバ配列のコピー数／スターチス配列のコピー数 = Fs/Ls比」を用いて、ソバの混入量を求めることとした。なお、各種そば粉のLo/Fo比を測定した時の生データを表4Aと表4Bに示す。

【0123】

【表3】

各種そば粉の Lo/Fo 比

試料名		Lo / Fo 1回目測定		Lo / Fo 2回目測定		Lo / Fo 1回目と2回目測定の 平均
		測定値	平均	測定値	平均	
白花そば粉 100%	No. 1	2.23	2.37	2.24	2.36	2.36
	No. 2	2.38		2.44		
	No. 3	2.12		2.11		
	No. 4	2.84		2.70		
	No. 5	2.12		2.11		
	No. 6	2.50		2.56		
ダッタンそば粉 100%	No. 1	4.33	4.82	4.06	4.69	4.75
	No. 2	5.42		5.27		
	No. 3	4.70		4.72		
高嶺ルビーそば粉 100%	No. 1	3.40	3.20	3.66	3.30	3.25
	No. 2	2.58		2.40		
	No. 3	3.61		3.85		
グレートルビーそば粉 100%	No. 1	2.39	2.67	2.38	2.72	2.70
	No. 2	2.92		2.92		
	No. 3	2.72		2.87		

【0124】

【表4A】

各種そば粉のLo/Fo比測定の実データ(1回目測定)

各種そば粉の測定の実データ(1回目)

Fagopyrum: そば配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (そば粉)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	14.4 2.70E+07	26,018,826
		14.6 2.50E+07	
	No. 2	14.8 2.10E+07	20,441,034
		14.9 2.00E+07	
	No. 3	14.3 3.00E+07	29,482,716
		14.4 2.90E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 1	14.7 2.30E+07	22,277,192
		14.8 2.20E+07	
	No. 2	14.3 3.00E+07	29,360,360
		14.4 2.80E+07	
	No. 3	14.6 2.50E+07	24,691,600
		14.6 2.40E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.2 1.60E+07	14,956,499
		15.4 1.40E+07	
	No. 2	15.6 1.30E+07	12,823,798
		15.6 1.30E+07	
	No. 3	15.3 1.70E+07	14,854,976
		15.4 1.40E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	15.1 1.70E+07	17,177,656
		15.2 1.70E+07	
	No. 2	14.4 2.80E+07	26,409,648
		14.6 2.50E+07	
	No. 3	14.9 2.00E+07	19,925,876
		14.9 1.90E+07	

Sample Information (検査線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fo copy)
1,000 copy	29.7	1.00E+03	
	30.0	1.00E+03	1,000
10,000 copy	26.3	1.00E+04	
	26.3	1.00E+04	10,000
100,000 copy	22.9	1.00E+05	
	22.8	1.00E+05	100,000
1,000,000 copy	19.3	1.00E+06	
	19.3	1.00E+06	1,000,000
10,000,000 copy	15.7	1.00E+07	
	15.7	1.00E+07	10,000,000
100,000,000 copy	12.7	1.00E+08	
	12.8	1.00E+08	100,000,000
No Template	45.0		
Control	45.0		0

Standard Curve

Slope: -3.461

Y intercept: 40.165

Correlation Coeff: 0.999

Threshold Line: 0.26

Base Line: (3, 10)

Limonium: スターチ配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (そば粉)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Lo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	13.8 5.70E+07	58,118,672
		13.7 5.90E+07	
	No. 2	14.0 4.90E+07	48,713,304
		14.0 4.90E+07	
	No. 3	13.6 6.20E+07	62,454,708
		13.6 6.30E+07	
ダッタン そば粉 100%	No. 4	13.7 6.10E+07	63,166,024
		13.6 6.50E+07	
	No. 5	13.6 6.20E+07	62,256,136
		13.6 6.20E+07	
	No. 6	13.7 6.10E+07	61,832,168
		13.6 6.20E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	13.6 6.50E+07	64,791,648
		13.6 6.50E+07	
	No. 2	13.5 6.90E+07	69,477,952
		13.5 6.90E+07	
	No. 3	13.4 7.20E+07	69,844,016
		13.5 6.80E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	13.8 5.60E+07	58,425,484
		13.7 6.00E+07	
	No. 2	13.5 6.70E+07	68,158,464
		13.5 6.90E+07	
	No. 3	13.4 7.10E+07	72,032,008
		13.4 7.30E+07	

Sample Information (検査線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Lo copy)
1,000 copy	29.7	1.00E+03	
	30.0	1.00E+03	1,000
10,000 copy	26.6	1.00E+04	
	26.8	1.00E+04	10,000
100,000 copy	23.1	1.00E+05	
	23.1	1.00E+05	100,000
1,000,000 copy	19.6	1.00E+06	
	19.6	1.00E+06	1,000,000
10,000,000 copy	16.1	1.00E+07	
	16.2	1.00E+07	10,000,000
100,000,000 copy	13.1	1.00E+08	
	13.1	1.00E+08	100,000,000
No Template	45.0		
Control	45.0		0

Standard Curve

Slope: -3.390

Y intercept: 40.155

Correlation Coeff: 0.999

Threshold Line: 0.26

Base Line: (3, 10)

各種そば粉のLo/Fe比 (1回目測定)		
Sample Name	そば粉100%のLo/Fe比 測定値	Mean
白花 そば粉 100%	No. 1 2.23	2.37
	No. 2 2.38	
	No. 3 2.12	
	No. 4 2.84	
	No. 5 2.12	
	No. 6 2.50	
ダウタン そば粉 100%	No. 1 4.33	4.82
	No. 2 5.42	
	No. 3 4.70	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1 3.40	3.20
	No. 2 2.58	
	No. 3 3.61	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1 2.39	2.67
	No. 2 2.92	
	No. 3 2.72	

【0125】

【表 4 B】

各種そば粉の Lo/Fo 比測定の実データ(2 回目測定)

各種そば粉の測定の実データ(2回目)

Fagopyrum: そば配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (そば粉)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	14.3 2.90E+07	26,518,246
		14.5 2.40E+07	
	No. 2	14.7 2.10E+07	21,164,988
		14.7 2.10E+07	
	No. 3	14.1 3.30E+07	31,558,050
		14.2 3.00E+07	
	No. 4	14.6 2.30E+07	23,066,282
		14.6 2.30E+07	
	No. 5	14.1 3.20E+07	30,485,280
		14.2 2.90E+07	
	No. 6	14.5 2.50E+07	25,047,642
		14.5 2.50E+07	
ダツタン そば粉 100%	No. 1	15.1 1.70E+07	16,326,365
		15.2 1.60E+07	
	No. 2	15.4 1.40E+07	13,136,491
		15.5 1.30E+07	
	No. 3	15.0 1.70E+07	15,677,427
		15.3 1.40E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.0 1.70E+07	16,998,440
		15.1 1.70E+07	
	No. 2	14.1 3.30E+07	30,135,004
		14.3 2.80E+07	
	No. 3	14.9 1.90E+07	18,706,756
		15.0 1.80E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	14.1 3.20E+07	29,831,912
		14.3 2.80E+07	
	No. 2	14.5 2.40E+07	23,647,696
		14.6 2.30E+07	
	No. 3	14.4 2.60E+07	24,742,444
		14.6 2.30E+07	

Sample Information (検量線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fo copy)
10,000 copy	26.2	1.00E+04	10,000
	26.3	1.00E+04	
100,000 copy	22.8	1.00E+05	100,000
	22.6	1.00E+05	
1,000,000 copy	19.2	1.00E+06	1,000,000
	19.3	1.00E+06	
10,000,000 copy	15.7	1.00E+07	10,000,000
	15.7	1.00E+07	
100,000,000 copy	12.2	1.00E+08	100,000,000
	12.3	1.00E+08	
1,000,000,000 copy	9.2	1.00E+09	1,000,000,000
	9.2	1.00E+09	
No Template	45.0		0
Control	45.0		

Standard Curve

Slope: -3.43 Y-intercept: 39.853
Correlation Coeff: 0.999 Threshold Line: 0.26
Base Line: [1, 5]

Limonium: スターチ配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (そば粉)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Lo copy)
白花 そば粉 100%	No. 1	15.9 5.90E+07	59,483,544
		15.9 6.00E+07	
	No. 2	16.1 5.10E+07	51,726,840
		16.1 5.30E+07	
	No. 3	15.7 6.70E+07	66,458,736
		15.8 6.50E+07	
	No. 4	15.9 6.00E+07	62,320,324
		15.8 6.40E+07	
	No. 5	15.8 6.60E+07	64,315,224
		15.8 6.30E+07	
	No. 6	15.8 6.30E+07	64,025,272
		15.8 6.50E+07	
ダツタン そば粉 100%	No. 1	15.7 6.60E+07	66,255,696
		15.7 6.60E+07	
	No. 2	15.6 7.10E+07	69,291,272
		15.7 6.80E+07	
	No. 3	15.5 7.50E+07	74,041,168
		15.6 7.30E+07	
高嶺ルビー そば粉 100%	No. 1	15.9 5.90E+07	62,179,320
		15.7 6.60E+07	
	No. 2	15.7 7.00E+07	72,273,880
		15.6 7.50E+07	
	No. 3	15.7 7.00E+07	72,066,528
		15.6 7.40E+07	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1	15.6 7.30E+07	71,145,008
		15.7 6.90E+07	
	No. 2	15.7 6.80E+07	68,944,320
		15.7 7.00E+07	
	No. 3	15.5 7.10E+07	71,057,568
		15.6 7.10E+07	

Sample Information (検量線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Lo copy)
10,000 copy	28.6	1.00E+04	10,000
	28.8	1.00E+04	
100,000 copy	25.4	1.00E+05	100,000
	25.6	1.00E+05	
1,000,000 copy	21.7	1.00E+06	1,000,000
	21.8	1.00E+06	
10,000,000 copy	18.4	1.00E+07	10,000,000
	18.4	1.00E+07	
100,000,000 copy	15.1	1.00E+08	100,000,000
	15.2	1.00E+08	
1,000,000,000 copy	11.8	1.00E+09	1,000,000,000
	11.8	1.00E+09	
No Template	45.0		0
Control	45.0		

Standard Curve

Slope: -3.398 Y-intercept: 42.303
Correlation Coeff: 0.999 Threshold Line: 1.02
Base Line: [1, 5]

各種そば粉のLo/Fo比
(2回目測定)

Sample Name	そば粉100%のLo/Fo比	
	測定値	Mean
白花 そば粉 100%	No. 1 2.24	2.36
	No. 2 2.44	
	No. 3 2.11	
	No. 4 2.70	
	No. 5 2.11	
	No. 6 2.56	
ダッタン そば粉 100%	No. 1 4.06	4.69
	No. 2 5.27	
	No. 3 4.72	
高濃ルビー そば粉 100%	No. 1 3.66	3.30
	No. 2 2.40	
	No. 3 3.85	
グレートルビー そば粉 100%	No. 1 2.38	2.72
	No. 2 2.92	
	No. 3 2.87	

【0126】

白花ソバ粉に対して、最も測定値のずれが大きかったダッタンソバ粉でも約2倍であり、本方法はPCRによる定量法としては十分な精度を有していると考えられる。

【0127】

G. スターチス標準を添加した擬似混入試料から抽出したDNA中の「ソバ配列のコピー数/スターチス配列のコピー数比」の算出と、擬似混入試料中のソバ混入量の計算

ソバ配列とスターチス配列の定量的PCR法は、実施例1. のF. とG. に記載の方法で行なった。検量線をもとに、スターチス標準を添加した擬似混入試料から抽出したDNA 50ng中のソバ配列のコピー数と、スターチス配列のコピー数を定量した。その定量値をもとに、「ソバ配列のコピー数/スターチス配列のコピー数=Fs/Ls比」を算出した。なお、擬似混入試料のFs/Ls比は、同一サンプルから3点抽出、各点2ウェルで測定して算出した。ここで算出したFs/Ls比と、実施例2. F. で算出したLo/Fo比を用い、下式により、擬似混入試料(1g)中のソバの混入量(μ g)を求めた。

$$\text{ソバの混入量 ppm } (\mu\text{g/g}) = F_s / L_s \times L_o / F_o \times 1,000,000$$

【0128】

Fs/Ls比測定と混入量算出の結果、表5に示す通り、100ppm白花ソバ粉／小麦の粉碎物、10ppm白花ソバ粉／小麦の粉碎物、10ppm白花ソバ粉／米の粉碎物、10ppm白花ソバ粉／小麦と米の粉碎物について、2回測定した結果ともに妥当な値を得ることができた。なお、各種擬似混入試料のFs/Ls比を測定した時の生データを表6Aと表6Bに示す。

【0129】

【表5】

擬似混入試料中のそば混入量の測定結果まとめ(PCR)

擬似混入試料中のそば混入量の測定結果

擬似混入試料名		そば粉濃度 (ppm: $\mu\text{g/g}$)	
		1回目測定	2回目測定
100ppm そば/小麦	No. 1	97.9	83.0
	No. 2	84.5	75.5
	No. 3	89.6	81.6
10ppm そば/小麦	No. 1	6.4	4.6
	No. 2	14.4	10.8
	No. 3	8.9	7.7
10ppm そば/米	No. 1	9.0 (参考値)	7.5
	No. 2	7.5	5.1
	No. 3	5.5 (参考値)	4.7
10ppm そば/米と小麦	No. 1	9.2	6.2
	No. 2	7.0	4.9
	No. 3	9.0	8.2

※ 各擬似混入試料から3点サンプリングして抽出、各点についてn=2で測定した。

※ 擬似混入試料5gにスターチス標準1gを添加して抽出したDNA 50ngをPCRに供した。

※ 擬似混入試料中のそば粉濃度(ppm)の算出には、白花そばのLo/Fo値 = 2.36 を用いた。

※ 10ppm そば/米のNo.1, No. 3については、スターチス配列のコピー数定量において、検量線範囲外となったため、参考値として記載した。

【0130】

【表 6 A】

各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ(1 回目)

擬似混入試料の測定の実データ(1回目)

Fagopyrum: そば配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (擬似混入試料)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fs copy)
100ppm そば/小麦	No. 1	29.4 1.40E+03	1,393
		29.4 1.40E+03	
	No. 2	29.7 1.10E+03	1,162
		29.6 1.20E+03	
	No. 3	29.6 1.20E+03	1,280
		29.5 1.30E+03	
10ppm そば/小麦	No. 1	33.7 7.90E+01	82
		33.6 8.50E+01	
	No. 2	32.3 2.10E+02	200
		32.4 1.90E+02	
	No. 3	33.1 1.20E+02	121
		33.1 1.20E+02	
10ppm そば/米	No. 1	31.1 4.40E+02	445
		31.1 4.50E+02	
	No. 2	31.7 2.90E+02	300
		31.7 3.00E+02	
	No. 3	32.0 2.50E+02	260
		31.9 2.70E+02	
10ppm そば/米+小麦	No. 1	32.1 2.40E+02	214
		32.4 1.90E+02	
	No. 2	33.0 1.30E+02	143
		32.7 1.60E+02	
	No. 3	32.3 2.10E+02	210
		32.3 2.10E+02	

Sample Information (検査線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fs copy)
10 copy	37.2	1.00E+01	10
	37.3	1.00E+01	
100 copy	33.1	1.00E+02	100
	33.4	1.00E+02	
1,000 copy	29.7	1.00E+03	1,000
	29.7	1.00E+03	
10,000 copy	26.3	1.00E+04	10,000
	26.3	1.00E+04	
100,000 copy	22.9	1.00E+05	100,000
	22.8	1.00E+05	
1,000,000 copy	19.2	1.00E+06	1,000,000
	19.3	1.00E+06	
10,000,000 copy	15.7	1.00E+07	10,000,000
	15.7	1.00E+07	
100,000,000 copy	12.7	1.00E+08	100,000,000
	12.7	1.00E+08	
No Template	45.0		0
Control	45.0		

Standard Curve

Slope: -3.504

Y-intercept: 40.394

Correlation Coeff: 0.999

Threshold Line: 0.26

Base Line: (3, 10)

Limonium: スターチス配列コピー数の定量PCR			
Sample Information (擬似混入試料)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Ls copy)
100ppm そば/小麦	No. 1	14.6 3.40E+07	33,597,292
		14.6 3.30E+07	
	No. 2	14.7 3.20E+07	32,452,070
		14.6 3.30E+07	
	No. 3	14.6 3.40E+07	33,721,376
		14.6 3.30E+07	
10ppm そば/小麦	No. 1	14.7 3.60E+07	30,161,998
		14.8 3.00E+07	
	No. 2	14.6 3.30E+07	32,846,720
		14.6 3.20E+07	
	No. 3	14.6 3.20E+07	31,901,436
		14.7 3.10E+07	
10ppm そば/米	No. 1	12.8 1.10E+08	116,638,192
		12.7 1.20E+08	
	No. 2	13.1 9.40E+07	94,101,296
		13.1 9.40E+07	
	No. 3	12.8 1.10E+08	112,316,848
		12.8 1.10E+08	
10ppm そば/米+小麦	No. 1	13.9 5.50E+07	54,842,760
		13.9 5.50E+07	
	No. 2	14.1 4.70E+07	48,308,684
		14.0 4.90E+07	
	No. 3	13.8 5.70E+07	55,342,960
		13.9 5.40E+07	

Sample Information (検査線用プラスミド)			
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Ls copy)
10 copy	36.7	1.00E+01	10
	36.6	1.00E+01	
100 copy	33.2	1.00E+02	100
	33.4	1.00E+02	
1,000 copy	29.8	1.00E+03	1,000
	29.8	1.00E+03	
10,000 copy	26.7	1.00E+04	10,000
	27.1	1.00E+04	
100,000 copy	23.1	1.00E+05	100,000
	23.0	1.00E+05	
1,000,000 copy	19.6	1.00E+06	1,000,000
	19.8	1.00E+06	
10,000,000 copy	16.3	1.00E+07	10,000,000
	16.2	1.00E+07	
100,000,000 copy	13.1	1.00E+08	100,000,000
	13.2	1.00E+08	
No Template	45.0		0
Control	45.0		

Standard Curve

Slope: -3.382

Y-intercept: 40.043

Correlation Coeff: 0.999

Threshold Line: 0.26

Base Line: (3, 10)

そば混入量の算出結果		そば混入量 (ppm: $\mu\text{g/g}$)
Sample Name	Fs/Ls	Fo/Ls = 2.36
100ppm そば/小麦	No. 1 4.1E-05	97.9 ppm
	No. 2 3.6E-05	84.5 ppm
	No. 3 3.8E-05	89.6 ppm
10ppm そば/小麦	No. 1 2.7E-06	6.4 ppm
	No. 2 6.1E-06	14.4 ppm
	No. 3 3.8E-05	8.9 ppm
10ppm そば/米	No. 1 3.8E-06	9.0 ppm(参考)
	No. 2 3.2E-06	7.5 ppm
	No. 3 2.3E-06	5.5 ppm(参考)
10ppm そば/米+小麦	No. 1 3.9E-06	9.2 ppm
	No. 2 3.0E-06	7.0 ppm
	No. 3 3.8E-06	9.0 ppm

※ 10ppm そば/米の検体混入試料については、スターチス
配列のコピー数が検量検範囲を超えたため、参考値とした。

【0131】

【表 6 B】

各種擬似混入試料のそば混入量測定の実データ(2 回目)

擬似混入試料の測定の実データ(2回目)

Fagopyrum: そば配列コピー数の定量PCR				
Sample Information (擬似混入試料)				
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fs copy)	
100ppm そば/小麦	No. 1	30.8 1.20E+03	1,180	
		30.8 1.20E+03		
	No. 2	31.1 9.40E+02	1,018	
		30.9 1.10E+03		
	No. 3	30.9 1.10E+03	1,143	
		30.8 1.20E+03		
10ppm そば/小麦	No. 1	35.2 6.20E+01	58	
		35.4 5.40E+01		
	No. 2	34.1 1.30E+02	148	
		33.7 1.70E+02		
	No. 3	34.6 9.20E+01	108	
		34.2 1.20E+02		
10ppm そば/米	No. 1	32.4 4.00E+02	423	
		32.3 4.40E+02		
	No. 2	33.1 2.50E+02	231	
		33.4 2.10E+02		
	No. 3	33.3 2.20E+02	249	
		33.0 2.80E+02		
10ppm そば/米+小麦	No. 1	33.7 1.70E+02	147	
		34.1 1.30E+02		
	No. 2	34.5 9.80E+01	109	
		34.2 1.20E+02		
	No. 3	33.3 2.20E+02	209	
		33.5 2.00E+02		

Sample Information (検査線用プラスミド)				
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Fs copy)	
10 copy	38.0	1.00E+01	10	
	38.1	1.00E+01		
100 copy	35.1	1.00E+02	100	
	34.2	1.00E+02		
1,000 copy	31.0	1.00E+03	1,000	
	31.2	1.00E+03		
10,000 copy	27.5	1.00E+04	10,000	
	27.5	1.00E+04		
100,000 copy	24.0	1.00E+05	100,000	
	24.0	1.00E+05		
1,000,000 copy	20.4	1.00E+06	1,000,000	
	20.4	1.00E+06		
10,000,000 copy	16.9	1.00E+07	10,000,000	
	16.9	1.00E+07		
100,000,000 copy	13.6	1.00E+08	100,000,000	
	13.7	1.00E+08		
1,000,000,000 copy	10.5	1.00E+09	1,000,000,000	
	10.6	1.00E+09		
No Template	45.0		0	
Control	45.0			

Standard Curve
 Slope: -3.473 Y-intercept: 41.45
 Correlation Coeff: 0.999 Threshold Line: 0.51
 Base Line: (3, 8)

Limonium: スターチ配列コピー数の定量PCR				
Sample Information (擬似混入試料)				
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Ls copy)	
100ppm そば/小麦	No. 1	16.4 3.40E+07	33,560,780	
		16.4 3.30E+07		
	No. 2	16.5 3.10E+07	31,837,948	
		16.4 3.20E+07		
	No. 3	16.4 3.30E+07	33,067,796	
		16.4 3.30E+07		
10ppm そば/小麦	No. 1	16.6 3.00E+07	29,930,496	
		16.5 3.00E+07		
	No. 2	16.4 3.30E+07	32,418,082	
		16.5 3.20E+07		
	No. 3	16.4 3.30E+07	32,839,880	
		16.4 3.30E+07		
10ppm そば/米	No. 1	14.4 1.30E+08	133,923,120	
		14.3 1.40E+08		
	No. 2	14.7 1.10E+08	107,428,504	
		14.7 1.10E+08		
	No. 3	14.4 1.30E+08	125,724,392	
		14.4 1.30E+08		
10ppm そば/米+小麦	No. 1	15.6 5.60E+07	56,432,404	
		15.6 5.70E+07		
	No. 2	15.7 5.20E+07	52,445,608	
		15.7 5.30E+07		
	No. 3	15.5 5.90E+07	60,105,248	
		15.5 6.10E+07		

Sample Information (検査線用プラスミド)				
Sample Name	Ct	Quantity	Mean (Ls copy)	
100 copy	35.2	1.00E+02	100	
	35.3	1.00E+02		
1,000 copy	31.5	1.00E+03	1,000	
	31.6	1.00E+03		
10,000 copy	28.4	1.00E+04	10,000	
	28.6	1.00E+04		
100,000 copy	24.7	1.00E+05	100,000	
	24.9	1.00E+05		
1,000,000 copy	21.5	1.00E+06	1,000,000	
	21.6	1.00E+06		
10,000,000 copy	17.9	1.00E+07	10,000,000	
	17.9	1.00E+07		
100,000,000 copy	14.7	1.00E+08	100,000,000	
	14.8	1.00E+08		
1,000,000,000 copy	11.6	1.00E+09	1,000,000,000	
	11.6	1.00E+09		
No Template	45.0		0	
Control	45.0			

Standard Curve
 Slope: -3.385 Y-intercept: 41.855
 Correlation Coeff: 0.999 Threshold Line: 0.77
 Base Line: (3, 8)

そば混入量の算出結果		そば混入量 (ppm: $\mu\text{g/g}$)	
Sample Name	Fo/Ls	Fo/Ls = 2.36	
100ppm そば/小麦	No. 1	3.5E-05	83.0 ppm
	No. 2	3.2E-05	75.5 ppm
	No. 3	3.5E-05	81.6 ppm
10ppm そば/小麦	No. 1	1.9E-06	4.6 ppm
	No. 2	4.6E-06	10.8 ppm
	No. 3	3.3E-06	7.7 ppm
10ppm そば/米	No. 1	3.2E-06	7.5 ppm
	No. 2	2.2E-06	5.1 ppm
	No. 3	2.0E-06	4.7 ppm
10ppm そば/米+小麦	No. 1	2.6E-06	6.2 ppm
	No. 2	2.1E-06	4.9 ppm
	No. 3	3.5E-06	8.2 ppm

【0132】

【発明の効果】

本発明の食品または食品原材料中に混入した特定植物属に含まれる植物を定量するPCR法によると、食品または食品原材料中における特定植物属の植物の極微量の存在を検出するとともに定量することが可能であることから、ソバ属、落花生属、小麦属及び大豆属等のアレルギー原因となる植物属の植物の混入の有無およびその定量をするのに特に有効である。また、被検対象とする試料毎のDNA抽出効率やPCR反応の阻害などの影響に対する補正の方法として、外部から精製DNAを標準として添加して反応溶液中のPCR反応の阻害などの影響に対する補正を行うのではなく、外部から精製DNA以外の標準植物由来の試料を添加したサンプルから定量対象の特定植物属由来のDNAと標準植物由来のDNAを同時に抽出して定量的PCR法を行うことにより、標準植物由来の試料と定量対象の特定植物属由来の試料との間で、DNA抽出効率やPCR反応の阻害などの影響が均一な条件で測定できるため、非常に信頼度の高い定量が可能である。また、DNA抽出効率やPCR反応の阻害等の影響、さらには被検対象とする試料中のDNA含有量の違いに対しても補正が可能であるという、有利な効果を有している。また、例えば塩等のDNAを含有していない食品原材料または当該原材料を含む食品中の特定植物属に含まれる植物を適切に定量検出することも可能である。

【0133】

したがって、本発明は、食品または食品原材料中に混入しているアレルギーの原因となる特定植物属に含まれる植物の定量的検出に有用である。さらに、PCR法による定量分析は、偽陽性が出た場合に、そのPCR増幅産物をDNA配列の解析に供することにより、確実に偽陽性を除外することができるという点から、産業上利用性に優れているといえる。

【0134】

さらに、本定量的PCR法によると、ELISA法よりダイナミックレンジが広く、かつ食品または食品原材料中に混入した特定の原材料の定量的検出に十分な特異性および感度が高いものとすることができる。また、合成品（プライマー、プローブ）を使用することにより測定結果の再現性が高く、かつ信頼度も高いものとすることができる。

【0135】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> House Foods Corporation

<120> The quantitative PCR method of certain plants belonging to a genus of interest in food or food raw material

<130> P03-0425

<160> 64

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 73

<212> DNA

<213> *Fagopyrum esculentum*

<400> 1

caacggatat ctcggctctc gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcatg acttggtgtg 60

aattgcagaa tcc 73

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

gcatttcgct acgttcttca tcgatgc 27

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 3

atcgcatctt gctacgttct tcatcg

26

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

agtatcgcat ttcgctacgt tcttcatc

28

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

gcatcgatga agaacgtagc gaaatgc

27

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

cgatgaagaa cgtacgaaa tgcgat

26

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

gatgaagaac gtagcgaaat gcgatact

28

<210> 8

<211> 71

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 8

acgaaccccg gcgcggactg cgccaaggac cacgaacaga agcgcgtccc gagcctcccg 60

gtccccgggc g 71

<210> 9

<211> 77

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 9

ccgggcggca cggcggcgtc gcgtcgtttc tacgaaacag aacgactctc ggcaacggat 60

atctcggctc tcgcatc 77

<210> 10

<211> 58

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 10

gccggaaggg cgagctcccc cgaaacacca agtacggcgg gcggaccccg aaggccat 58

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 11

ggaccacgaa cagaagcgcg tcccg

25

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 12

cacgaacaga agcgcggtccc g

2

1

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 13

ggaccacgaa cagaagcgcg t

21

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 14

cgccaaggac cacgaacaga ag

22

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 15

cgttgccgag agtcgttctg ttt

23

<210> 16

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 16
gtcgttctgt ttmktagaaa cgacgc

26

<210> 17
<211> 72
<212> DNA
<213> Arachis villosa

<400> 17

cgccccgtct caaacaagaa caaaaccccg gcgcggaaag cgccaaggaa gccaaacgtt 6

0

tctgctctcc cc 72

<210> 18
<211> 57
<212> DNA
<213> Arachis villosa

<400> 18

aacgttttctg ctctccccgc cggctccgga gacggcatcc ggtcggggcg acgagtg 57

<210> 19

<211> 60

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 19

ccgccggctc cggagacggc atccggtcgg ggcgacgagt gaccacaaga gttaagaacg 60

<210> 20

<211> 68

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 20

ggccggccgtg cgcgccgg cgccccgtct caaacaagaa caaaaccccg gcgcggaaag 60 c

gcccaagg 68

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 21

gcggaaagcg ccaaggaagc

20

<210> 22

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 22

ggcgcggaaa gcgccaa

17

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 23

caaaaccccg gcgcggaaa

19

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 24

cggcttccgg agacggca

18

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 25

cggctccgga gacggca

17

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 26

cgtcgccccg accggat

17

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 27

tcgtcgcccc gaccggat

18

<210> 28

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 28

ctcgtcgccc cgaccggat

19

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 29

actcgtcgcc ccgaccggat

20

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 30

cgccccgtct caaacaagaa caaaaccc

28

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 31

ccccgtctca aacaagaaca aaaccc

26

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 32

cgacgagtga ccacaagagt

20

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 33

aacgactctc ggcaacggat atct

24

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 34

tgctctcccc gccggc

16

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> Arachis villosa

<400> 35

agaacaaaac cccggcgcgg aaagcgccaa ggaagc

36

<210> 36

<211> 53

<212> DNA

<213> Fagopyrum esculentum

<400> 36

agggcacgcc tgtctgggcg tcacgcaccg cgtcgcccc tccccctct tcc

53

<210> 37

<211> 56

<212> DNA

<213> *Fagopyrum esculentum*

<400> 37

aagactacgc atcgcgctgc gtcgccgcga gccccgggag gaaagacccg agagag 56

<210> 38

<211> 57

<212> DNA

<213> *Arachis villosa*

<400> 38

acgggctctt ggtggggagc ggcaccgcgg cagatggtgg tcgagaacaa ccctcgt 57

<210> 39

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 39

ccatctgccg cggtgcc 17

<210> 40

<211> 60

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 40

tctcaacggg aatcgggatg cggcatctgg tccctcgtct ctcaaggac ggtggaccga 60

<210> 41

<211> 57

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 41

taccgcgccg gacacagcgc atggtgggcg tcctcgcttt atcaatgcag tgcattcc 57

<210> 42

<211> 57

<212> DNA

<213> Triticum aestivum

<400> 42

taccgtgtcg aacacagcgc atggtgggcg tctttgcttt atcaactgca gtgcata 57

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 43

cggcatctgg tccctcgtct

20

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 44

gcgaggacgc ccaccat

17

<210> 45

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 45

gcaaagacgc ccaccat

17

<210> 46

<211> 58

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 46

gttgctgcgc ggggtgtatg ctgacctccc gcgagcaccc gcctcgtggt tggttgaa

58

<210> 47

<211> 65

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 47

gttcatggcc gacttcgccg tgataaaatg gtggatgagc cacgctcgag accaatcacg

60

tgcga

65

<210> 48

<211> 62

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 48

gttcatggcc gacttcgccg tgataaaatg gatgagccac gctcgaccaa acgtgcgacc 60

gg 62

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 49

ctgacctccc gcgagcac 18

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 50

gcgtggctca tccaccattt tatca

25

<210> 51

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 51

gcgttgctca tccaccattt tatca

25

<210> 52

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 52

gcgttgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 53

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 53

gcattgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 54

gcgctgctca tccgccattt tgtca

25

<210> 55

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 55

gcgctgctca tccaccattt tgtca

25

<210> 56

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 56

gcgtggctca tccattttat ca

22

<210> 57

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 57

ttggacgtgt atcccttgtg gttc

24

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 58

cacgaagggtg aaagttgcgt tcat

24

<210> 59

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 59

tgtgcgacgc ggaatg

16

<210> 60

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 60

tctagacgcc aaggaccacg aacagaag

28

28

<210> 61

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 61

caaaagcttc gttgccgaga gtcgttctgt tt

32

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 62

acgaagcttt tggacgtgta tcccttgtgg ttc

33

<210> 63

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR primer

<400> 63

ggatcccacg aaggtgaaag ttgcgttcat

30

<210> 64

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> PCR probe

<400> 64

cgggacgcgc ttc

13

【図面の簡単な説明】

【図 1 A】

図 1 A は、白花ソバについて定性PCRの感度を調べた結果である。PCR後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

【図 1 B】

図 1 B は、ダットンソバについて定性PCRの感度を調べた結果である。PCR後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメー

ジアナライザーで解析した。

【図 2】

図 2 は、ソバ定性 P C R の特異性を調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

【図 3】

図 3 は、スターチス定性 P C R の特異性を、他の植物種子について調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

【図 4】

図 4 は、スターチス定性 P C R の特異性を、種々の食品原材料について調べた結果である。PCR 後、2 % アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイドで染色し、蛍光イメージアナライザーで解析した。

【図 5 A】

図 5 A は、そば配列の定量的 PCR 法の結果である。ソバ DNA 500pg、小麦、落花生、ダイズ、トウモロコシ、カラシ、胡椒、米はそれぞれ DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、ソバ以外では、定量検出域では検出されず、ソバのみが特異的に定量可能であることを確認した。

【図 5 B】

図 5 B は、そば配列の定量的 PCR 法の結果である。ソバは DNA 500pg、スターチス DNA 50ng について定量的 PCR 法を行ったが、スターチスでは定量検出域では検出されないことを確認した。

【図 6】

図 6 は、そば配列の定量的 PCR 法の結果である。ソバカズラ DNA について定量的 PCR 法を行い、ソバカズラは、DNA 50ng をテンプレートにした場合においても、検量線用プラスミド 10 コピーのテンプレートの場合に対して増幅速度が明らかに遅く、かつ Threshold Line にもかかることはなく、定量検出域では検出されず、ソバのみが特異的に定量可能であることを確認した。

【図 7】

図 7 は、検量線用プラスミドを用いてソバ配列の定量的PCR法を行った結果である。

【図 8】

図 8 は、図 7 の結果から得られたグラフである。

【図 9】

図 9 は、スターチス配列の定量的PCR法の結果である。スターチスはDNA 500pg をテンプレートとしてPCRを行った。小麦、落花生、ダイズ、トウモロコシ、カラシ、胡椒、米、ソバカズラはそれぞれDNA 50ngについて定量的PCR法を行ったが、定量検出域では検出されず、スターチスのみが特異的に定量可能であることを確認した。

【図 1 0】

図 1 0 は、検量線用プラスミドを用いてスターチス配列の定量的PCR法を行った結果である。

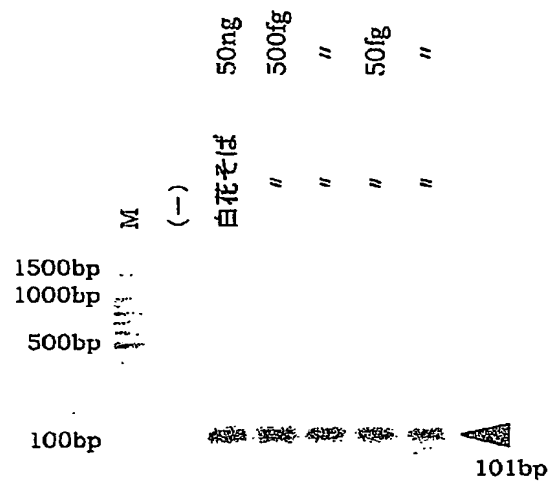
【図 1 1】

図 1 1 は、図 1 0 の結果から得られたグラフである。

【書類名】 図面

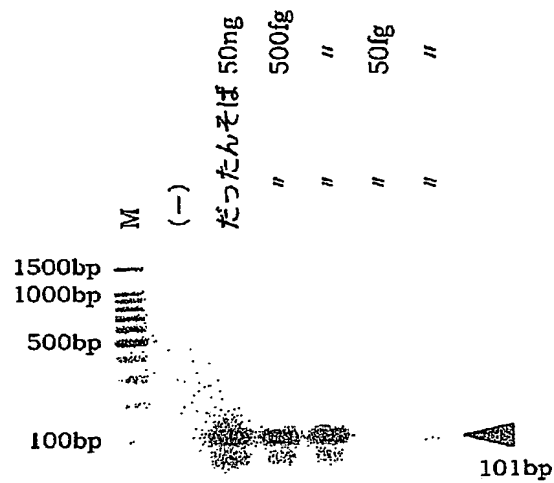
【図 1 A】

そば定性 PCR の感度 (白花そば)

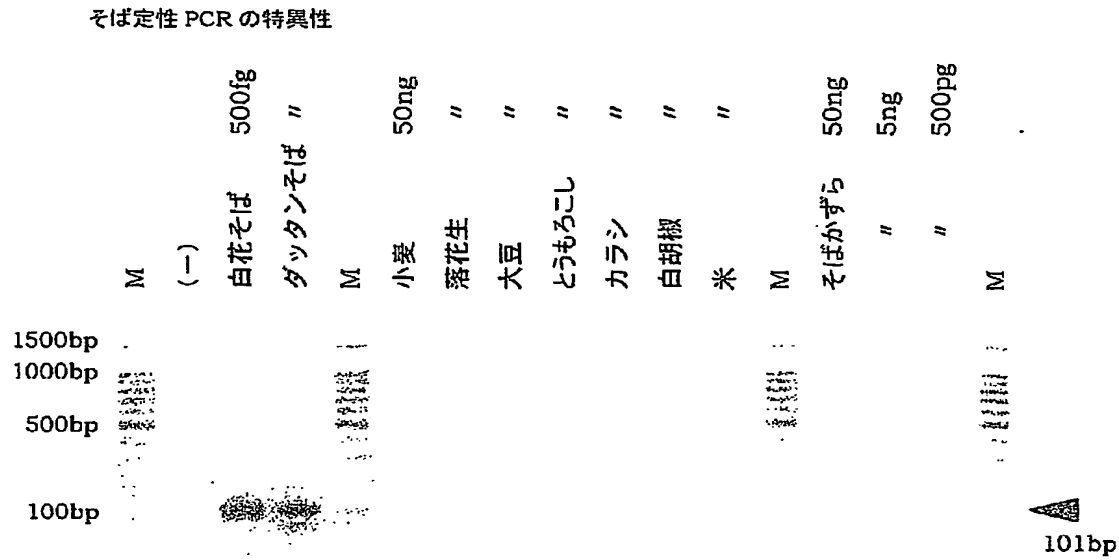


【図 1 B】

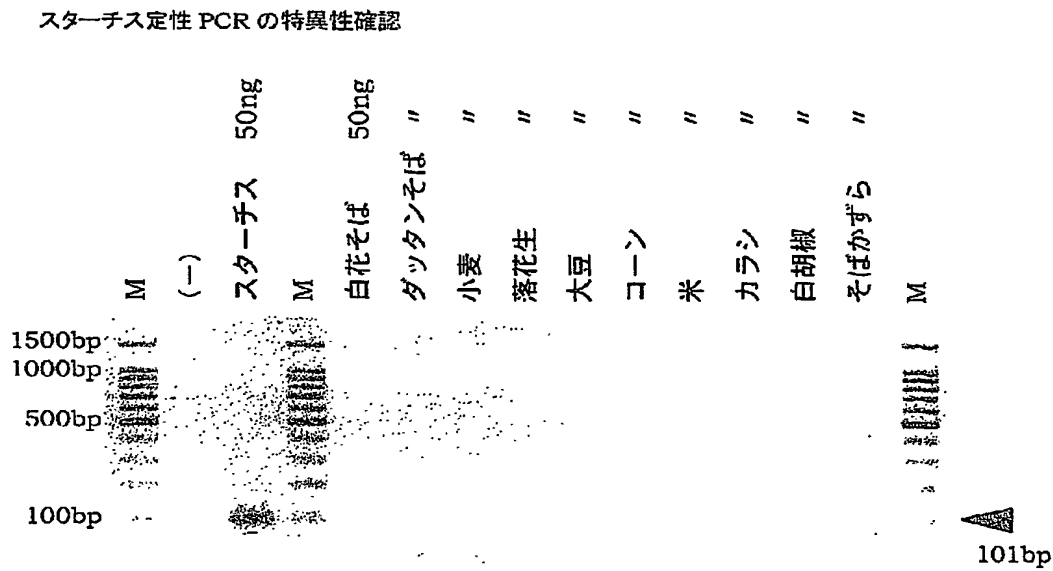
そば定性 PCR の感度 (ダツタンそば)



【図 2】

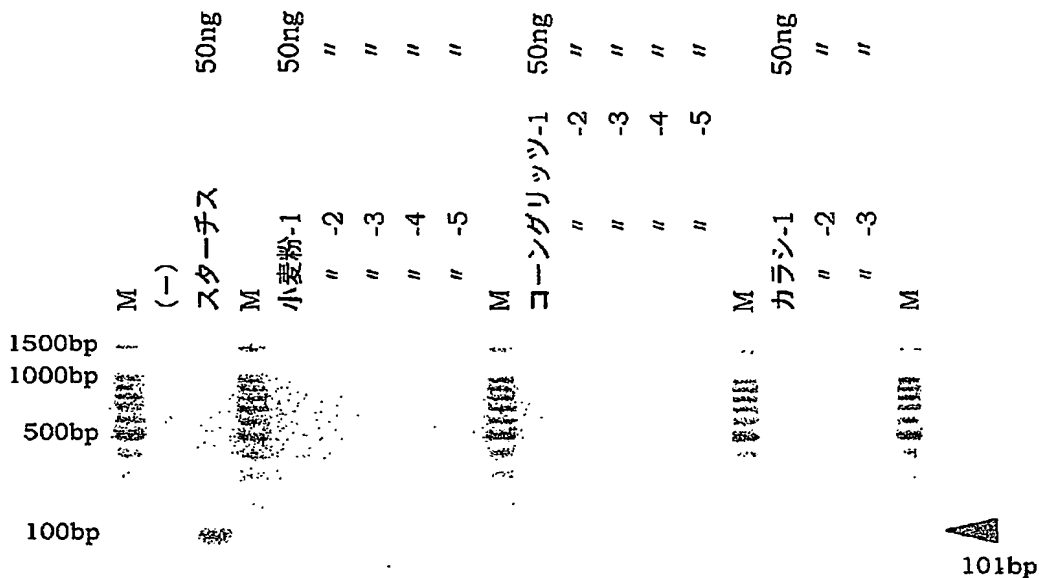


【図 3】



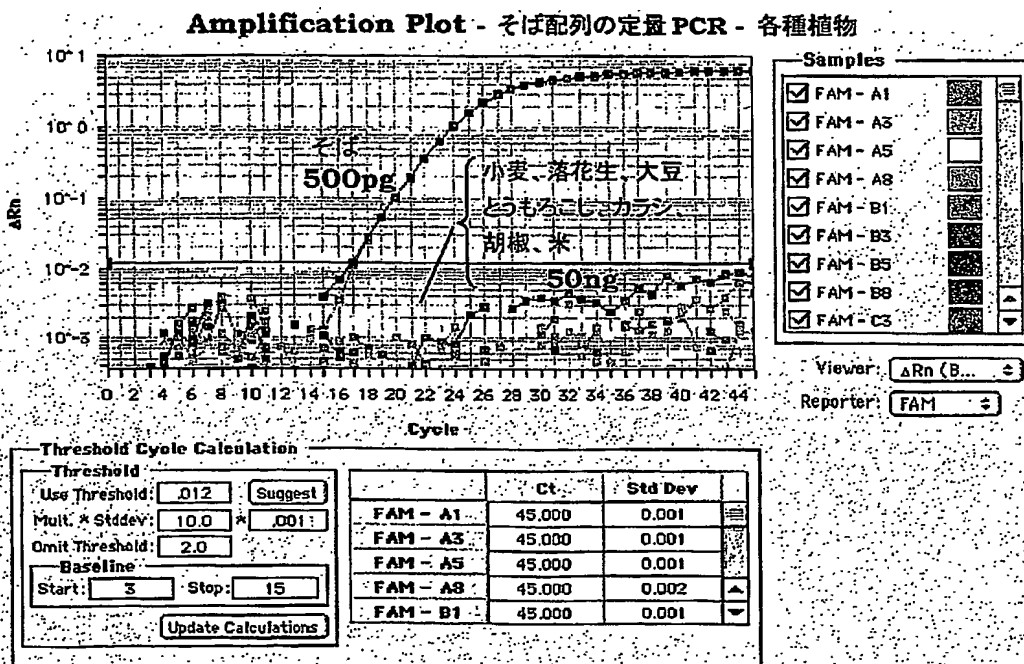
【図 4】

スターチス定性 PCR の特異性確認(原料)



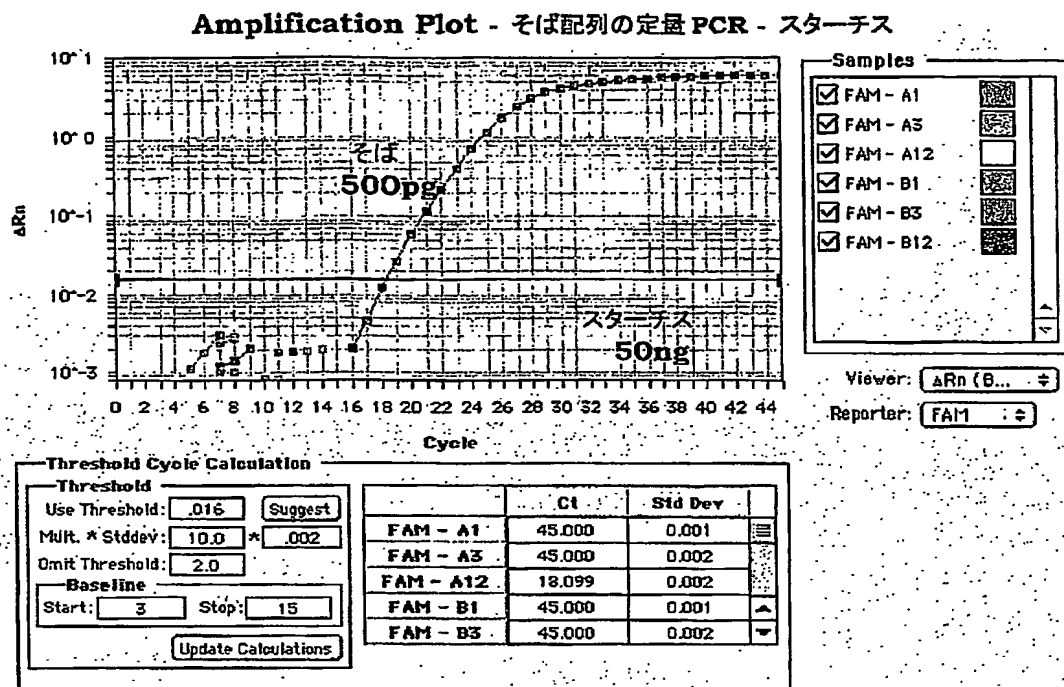
【図 5 A】

そば配列の定量 PCR: 各種植物 DNA の Amplification Plot-1



【図 5 B】

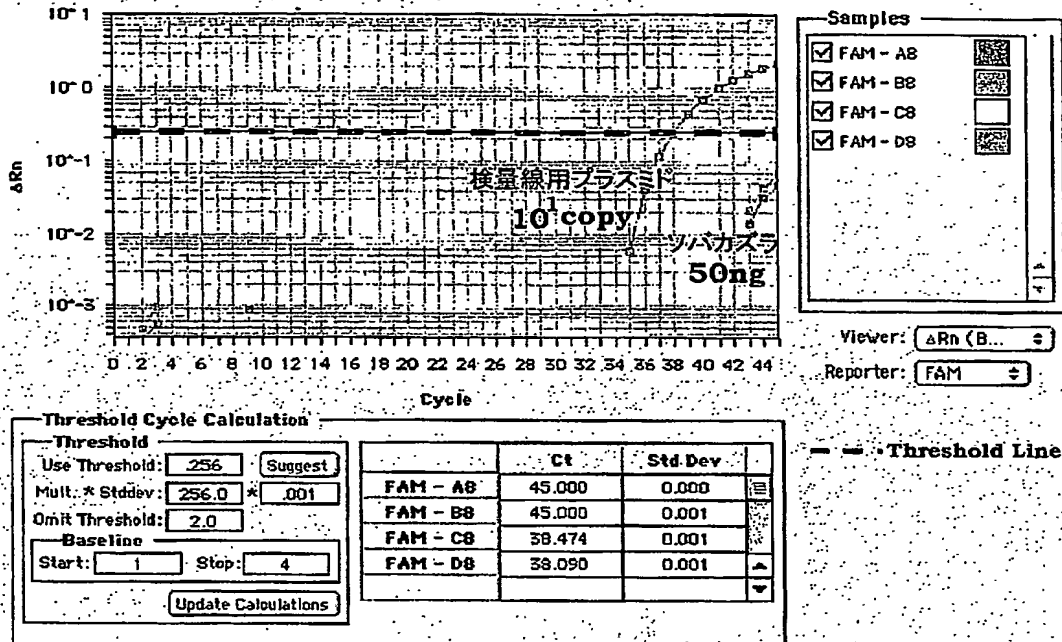
そば配列の定量 PCR: 各種植物 DNA の Amplification Plot-2



【図 6】

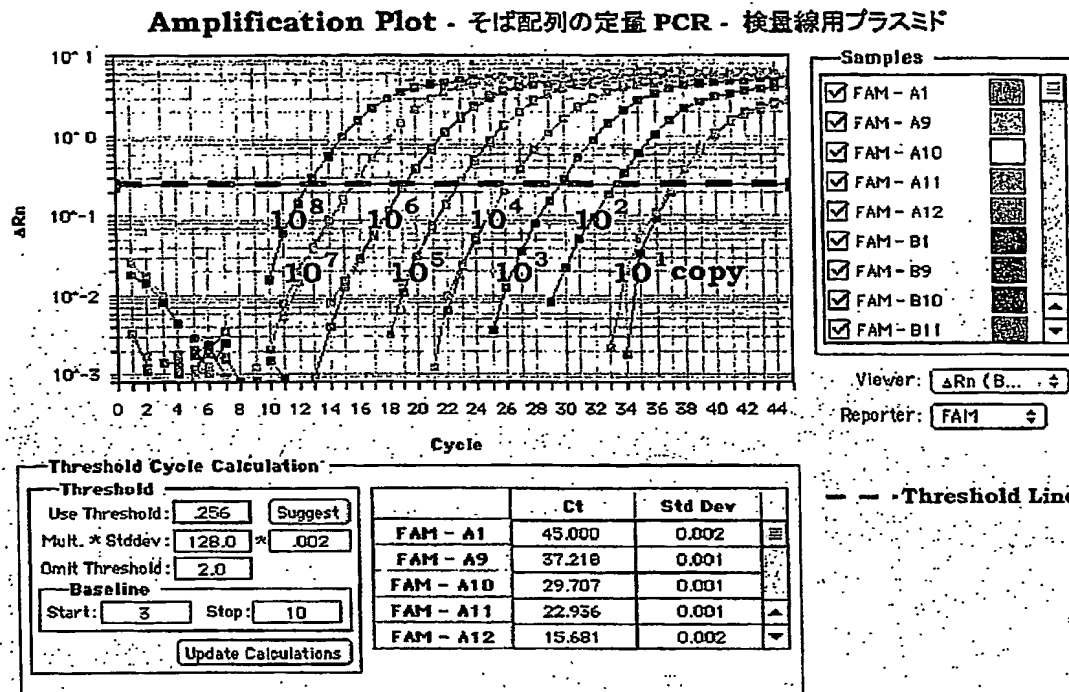
そば配列の定量 PCR: ソバカズラ DNA の Amplification Plot

Amplification Plot - そば配列の定量 PCR - ソバカズラ



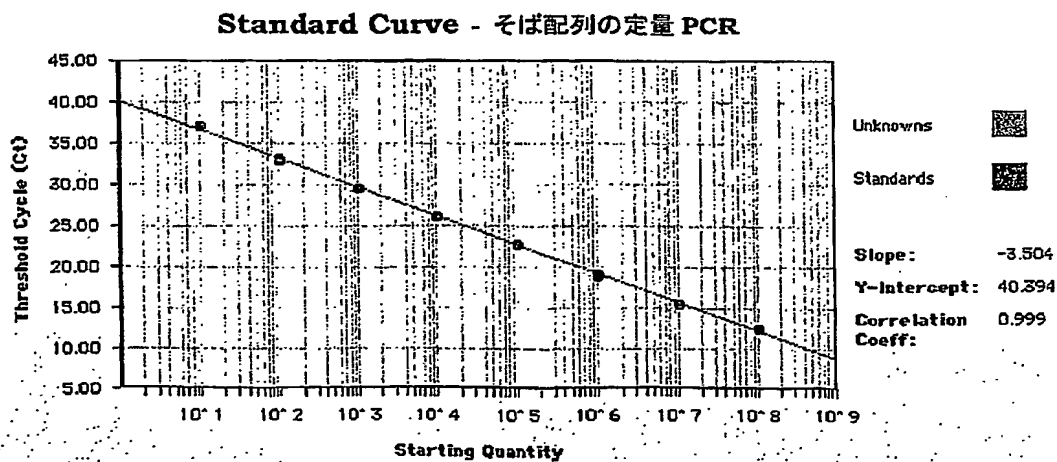
【図 7】

そば配列コピー数の定量 PCR: 検量線用プラスミド希釈系列の Amplification Plot



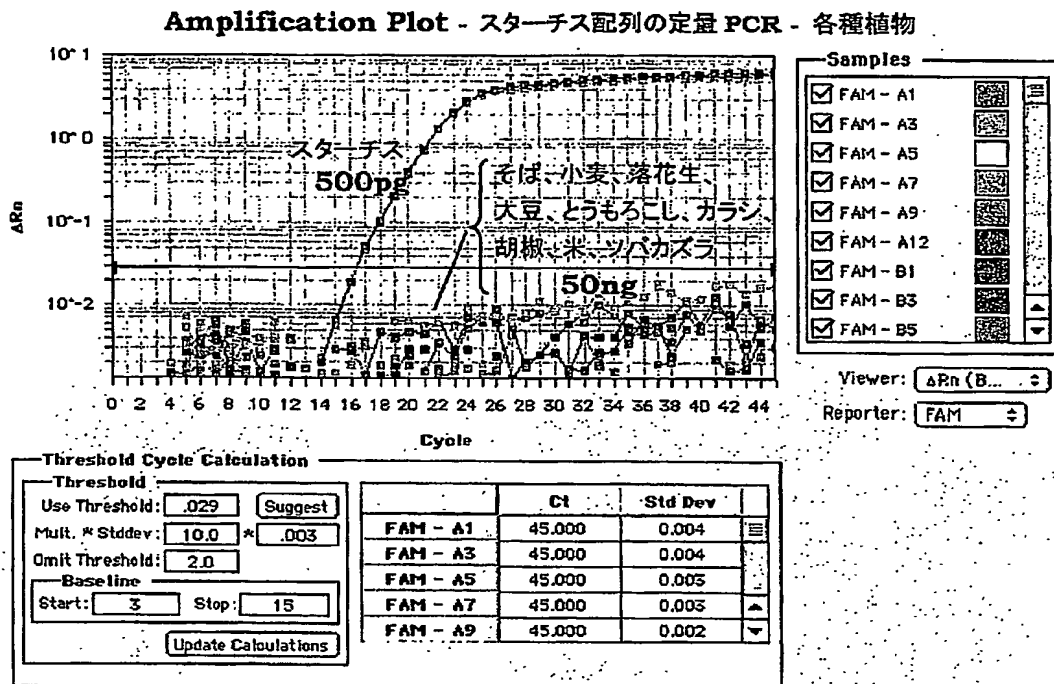
【図 8】

そば配列コピー数の定量 PCR: 検量線用プラスミド希釈系列で作成した検量線



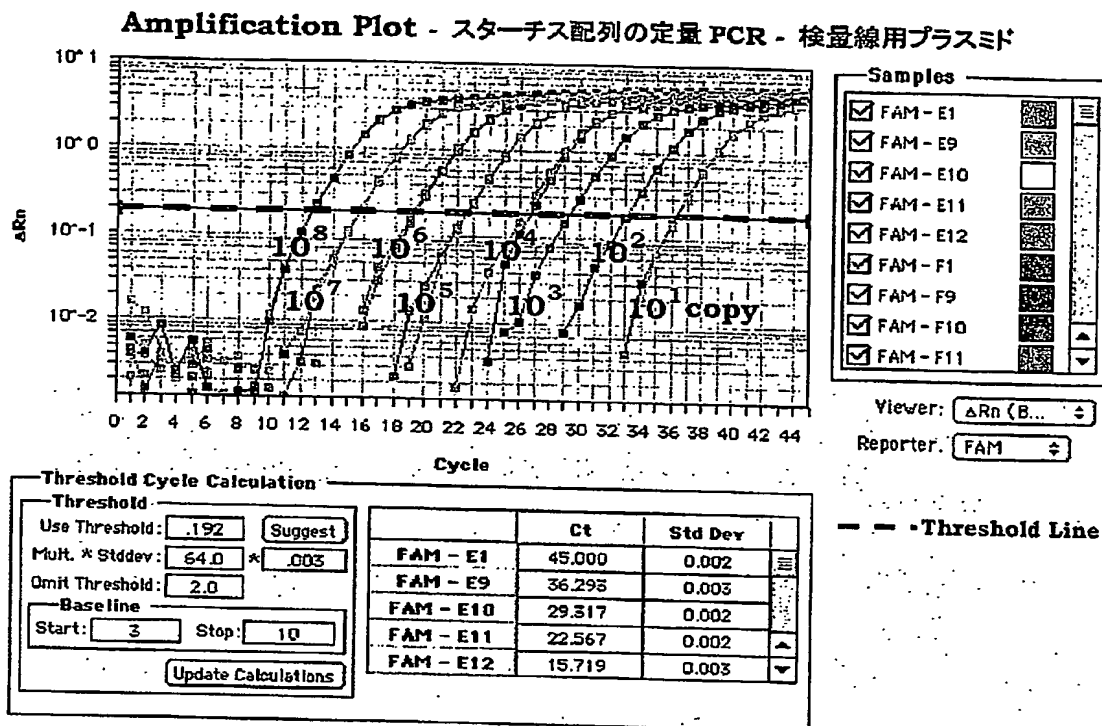
【図 9】

スターチス配列コピー数の定量 PCR: 各種植物 DNA の Amplification Plot



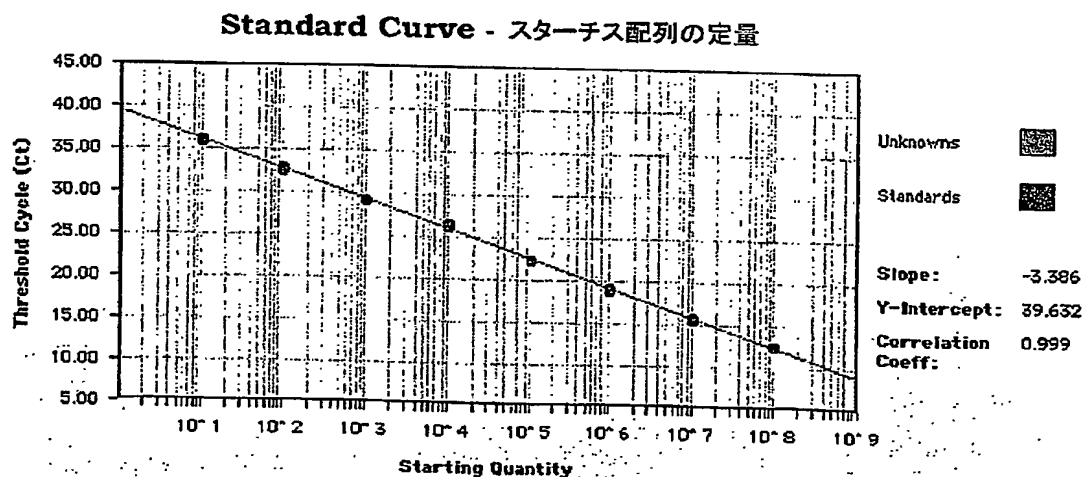
【図10】

スターチス配列コピー数の定量 PCR: 検量線用プラスミド希釈系列の Amplification Plot



【図11】

スターチス配列コピー数の定量 PCR: 検量線用プラスミド希釈系列で作成した検量線



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被検サンプル毎の抽出効率や検出反応の阻害物質の混入等に対する補正が可能であり、ELISA法よりダイナミックレンジが広く、かつ特異性が高く、感度の優れた定量方法を提供する。

【解決手段】 PCR法による食品または食品原材料中の特定植物属を定量する方法であって、(i)定量対象である特定植物属由来の試料と標準植物由来の試料との混合比が予め判っている補正用サンプルを用意し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、(ii)被検対象とする食品または食品原材料試料に既知量の標準植物由来の試料を添加した被検サンプルを調製し、該サンプルからゲノムDNAを抽出すること、(iii)標準植物由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマー、および対象とする特定植物属由来のゲノムDNAを特異的に増幅するためのプライマーを用いて該ゲノムDNAをテンプレートとして定量的PCR法を実施すること、(iv)補正用サンプルで検出される補正標準値として、補正用サンプルについて上記定量的PCRで得られた標準植物と定量対象である特定植物属についての値から、補正用サンプルについての、標準植物由来DNAのコピー数／特定植物属由来DNAのコピー数の値を求めること、ならびに(v)被検サンプルについて上記定量的PCRで得られた値から、特定植物属由来DNAのコピー数／標準植物由来DNAのコピー数の値を求め、これを上記補正標準値を用いて補正して、被検サンプル中に含まれる特定植物原料の量を算出すること、を含む上記方法が提供される。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 3 9 5 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 1 1 1 4 8 7]

1. 変更年月日 1 9 9 3 年 1 1 月 1 0 日

[変更理由] 名称変更

住 所 大阪府東大阪市御厨栄町 1 丁目 5 番 7 号

氏 名 ハウス食品株式会社